

灵芝孢子油通过下调 miR-21 促进人肺腺癌 SPC-A1 细胞凋亡

赵光锋, 郭葳, 赵晓寅, 王亚平, 侯亚义*
(南京大学医学院, 江苏 南京 210093)

摘要 目的:通过检测灵芝孢子油对人肺腺癌细胞 SPC-A1 增殖、凋亡与 miR-21 及其靶基因表达的影响,探讨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 SPC-A1 24 h 以及 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,Real-time PCR 检测 miR-21 及其靶基因 PTEN 和 PDCD4 的表达。结果:灵芝孢子油剂量、时间依耐性地抑制人肺腺癌 SPC-A1 细胞的增殖;当灵芝孢子油体积分数达到 0.2% 时,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;灵芝孢子油显著下调 SPC-A1 细胞中 miR-21 的表达并相应上调 PTEN 以及 PDCD4 基因的表达。结论:灵芝孢子油能显著抑制人肺腺癌细胞 SPC-A1 细胞增殖,引起细胞形态学改变。通过下调 miR-21 的表达,上调抑癌基因 PTEN 以及 PDCD4 的表达,从而促进肺癌细胞凋亡,达到抗肿瘤的作用。

关键词 SPC-A1; 灵芝孢子油; 细胞凋亡; miR-21; 抑癌基因

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,常规化疗药物尽管其抑制或杀伤肿瘤细胞的作用肯定,但其不良反应及多药耐药性难以克服。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、氨基酸多肽类、甾醇类、多种微量元素及有机锗、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^[2]。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]。研究发现灵芝多糖以及三萜类都具有抗肿瘤作用^[4-5]。但灵芝的免疫调节及抗肿瘤作用机制尚未十分明确,仍有许多问题尚待解决^[6]。

微小 RNA 在肿瘤里缺失或者不正常的扩增表达,表明 miRNAs 是一类参与人肿瘤形成的基因^[7]。miR-21 被认为是参与肿瘤发生发展最显著的一个 miRNA 分子之一。这是因为它不仅促进肿瘤的生长、增殖、抗凋亡和对抗肿瘤药物的应答,而且研究

发现 miR-21 在很多肿瘤里面都过表达^[8]。以往的研究表明 miR-21 过表达与 NSCLC 病人的不良预后有关,而且抑制 miR-21 可以抑制 A549 细胞的生长。所有的这些都表明 miR-21 是微小 RNA 分子中最可能具有原癌基因性质的 miRNA 分子之一^[9]。miR-21 通过转录后调控来下调肿瘤抑制因子 PDCD4 和 PTEN 的表达,从而促进肺癌的浸润和迁移。本实验研究灵芝孢子油对肺癌 SPC-A1 细胞株中 miR-21 及其靶基因表达的影响以及凋亡诱导作用,从 miR-21 基因表达和调控的角度来探讨灵芝孢子油抗肿瘤机制。

1 材料

1.1 细胞培养 人肺腺癌细胞系(SPC-A1)引自中国科学院上海细胞所,常规培养于含 10% 灭活小牛血清、100 U · mL⁻¹ 青霉素和 0.1 g · L⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置饱和湿度,37 °C,5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2 药物及试剂 灵芝孢子油由南京中科药业有限公司馈赠,纯度大于 99%; RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;实时荧光定量 PCR 用 SYBR green mix 购自 Roche 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 Sigma-Aldrich;引物由 Invitrogen (上海)公司合成。

稿件编号 20100910009

通信作者 * 侯亚义,教授,Tel: (025) 83686441, E-mail: yayihou@njy.edu.cn



2 方法

2.1 细胞准备及试验分组 肺癌 SPC-A1 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,置于 37℃,5% CO₂ 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。实验分为对照组、灵芝孢子油 0.05%,0.1%,0.2% 组等 4 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。

2.2 CCK-8 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,每孔以 1×10^4 细胞浓度进行接种,接种 24,48 h 待测孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L,培养箱孵育 4 h 后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 A,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 = $1 - (A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

2.3 流式细胞仪检测灵芝孢子油对 SPC-A1 细胞凋亡率的影响 收集处于对数生长期的 SPC-A1 细胞,接种于 24 孔板,每孔细胞数 2×10^5 个,细胞贴壁后,弃上清。加入不同浓度灵芝孢子油,使其体积分数分别为 0,0.05%,0.1%,0.2%,24 h 以及 48 h 后用 0.25% 胰酶收集所有细胞,PBS 洗 2 次,弃上清,用 100 μ L binding buffer 重悬。加 5 μ L Annexin V,5 μ L PI,室温避光孵育 10 min 后流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

2.4 实时定量 PCR 检测细胞内 miR-21 水平 收集处于对数生长期的 SPC-A1 细胞,接种于 12 孔板,每孔细胞数 5×10^5 个,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养过夜,次日加入灵芝孢子油,使最终体积分数为 0.1%,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 用紫外分光光度仪(Bio-Rad, USA)测 A₂₆₀。以 U6 snRNA 作为内参照,进行实时定量 PCR,反应条件参照 FastStart Universal SYBR Green Master Real-Time PCR Quantitation Kit 提供的说明书操作,miR-21 的相对表达水平用 Δ CT 和 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算。

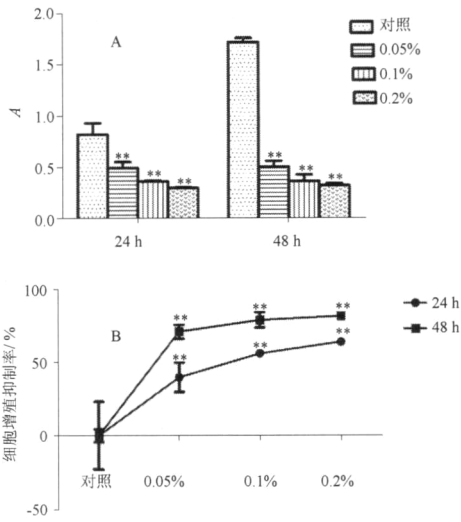
2.5 实时定量 PCR 检测 PTEN 和 PDCD4 mRNA 表达水平 利用 SYBR Green I 染料检测 SPC-A1 细胞中 PTEN 和 PDCD4 的 mRNA,实验分组同前,各组细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 12 孔板,次日加入灵芝孢子油,终体积分数为 0.1%,同时设立空白对照组,于 12 h 收集细胞,总 RNA 抽提按 Trizol 试

剂说明书进行,提取的总 RNA 用紫外分光光度仪测 A₂₆₀。总反应体积为 25 μ L,上、下游引物以及 1 μ L cDNA 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,PTEN 和 PDCD4 的 mRNA 的相对表达水平用 Δ CT 和 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算,GAPDH mRNA 作为内参照。

2.6 统计处理 统计方法采用 Graphpad Prism 5 软件进行处理,2 组数据采用 t 检验,多组数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为显著性差异。

3 结果

3.1 灵芝孢子油抑制 SPC-A1 细胞增殖呈时间、浓度依赖性 随着灵芝孢子油浓度以及时间的增加,SPC-A1 细胞活力显著下降,细胞增殖抑制率显著升高,当灵芝孢子油为 0.2% 时,在 48 h 的细胞增殖抑制率达到 80% 左右(图 1)。



与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 3,4 同)。

图 1 灵芝孢子油对 SPC-A1 细胞增殖活力的影响

3.2 灵芝孢子油对细胞形态的影响 不同灵芝孢子油(0%,0.05%,0.1%,0.2%)作用 SPC-A1 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 2)。

3.3 灵芝孢子油诱导 SPC-A1 细胞凋亡 灵芝孢子油处理 SPC-A1 细胞 24,48 h,随着灵芝孢子油浓度的增加,SPC-A1 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(图 3)。

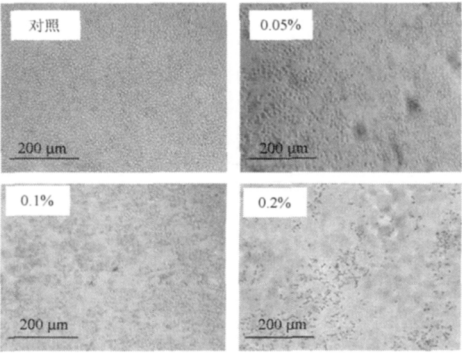


图 2 不同浓度灵芝孢子油处理 SPC-A1 细胞
24 h 细胞形态变化

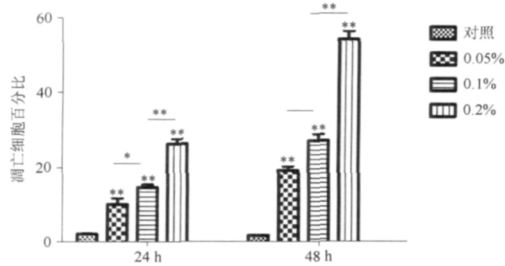
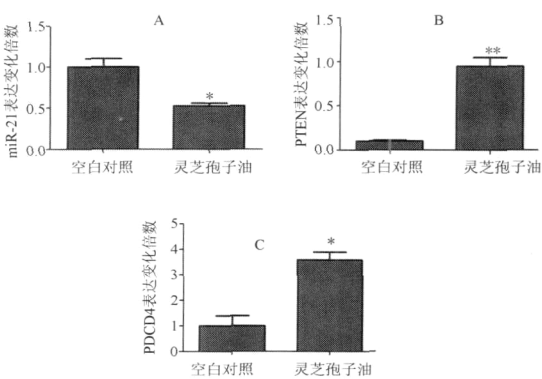


图 3 不同浓度灵芝孢子油处理 SPC-A1
细胞的早期凋亡比例

3.4 灵芝孢子油下调 miR-21,上调 PTEN 与 PD-CD4 基因的表达 0.1% 灵芝孢子油在处理 SPC-A1 细胞 12 h 后,miR-21 的表达被明显下调。而作为 miR-21 靶基因的抑癌基因 PTEN 以及 PDCD4 mRNA 的表达被显著上调。其中 PTEN 上调表达 10 倍左右,PDCD4 上调 4 倍左右(图 4)。

4 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。灵芝的主要活性成分包括多糖、三萜类、生物碱等,多篇文献报道其具有降血糖、降血脂、抗肿瘤等功效^[9]。已有研究表明,灵芝孢子油的抗肿瘤机制包括:通过调节免疫功能间接地抑制了肿瘤细胞的生长和增生,甚至杀伤肿瘤细胞^[4];激活 Caspase-3 从而引起细胞凋亡^[5];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、复制叉受阻等,从而抑制细胞的增殖^[3]。而本文首次从 miRNA 调控细胞凋亡角度来探讨灵芝孢子油的抗肿瘤机制。



A. miR-21; B. PTEN; C. PDCD4。

图 4 灵芝孢子油对 SPC-A1 细胞中 miR-21 及其靶基因
PTEN 以及 PDCD4 表达的影响

PTEN 是具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性的抑癌基因,现已证实该基因的突变、失活与多种肿瘤的发生、发展密切相关,被称为是“后 p53 时代的突变最多的肿瘤抑制基因”^[10-11]。目前,许多研究显示 PTEN 基因缺失、突变或表达产物的失活,影响肺癌的发生、发展。PDCD4 是一个新发现的肿瘤抑制因子,它可以与转录起始因子 eIF4A 和 eIF4G 相互作用来抑制一些促癌基因的翻译从而抑制 TPA 诱导的致瘤性转化、肿瘤的发生和发展^[12]。它在肺癌里面表达下调。此外,Jansen 等研究发现 PDCD4 的表达可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[13]。

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,致癌微小 mRNA 分子 miR-21 被显著下调,这表明灵芝孢子油抗肿瘤作用与 miR-21 有关。为了进一步证明 miR-21 分子的下调在灵芝孢子油抗肿瘤过程中发挥了重要作用,作者进一步检测其靶基因 PTEN 以及 PDCD4 的表达。PTEN 与 PDCD4 作为抑癌基因能够抑制肿瘤的发生发展、浸润和迁移^[8,14]。

综上,灵芝孢子油具有抑制肿瘤的作用,其机制与抑制 miR-21 表达从而提高抑癌基因 PTEN 以及 PDCD4 表达有关。本研究为灵芝孢子油治疗肺癌提供了实验依据。

参考文献

[1] Wargovich M J,Woods C,Hollis D M,et al. Herbs cancer prevention and health [J]. J Nutr,2001,131(11):3034.

[2] 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,2009,33:255.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Seikea M, Gotoa A, Okanoa T, et al. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers [J]. PNAS, 2009, 106(29):12085.

[7] Asangani I A, Rasheed S A K, Nikolova D A, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2008(27):2128.

[8] Zhang J G, Wang J J, Zhao F, et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Clin Chimica Acta, 2010,411:846.

[9] 幸而,吴松青. 两种灵芝孢子粉抗肿瘤及免疫功能研究 [J]. 临床药学,2008,18(4):57.

[10] 刘月娥. PTEN 及其与肺癌关系的研究进展 [J]. 实用癌症杂志,2008,23(5):534.

[11] 马国栋,刘志勇,邹卫,等. 抑癌基因 PTEN 在非小细胞肺癌中的表达及意义 [J]. 中国现代医生,2008,46(25):10.

[12] Cmarik J, Min H, Hegamyer G, et al. Differentially expressed protein Pdc4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96:14037.

[13] Jan sen A P, amalier C E, Stark C, et al. Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity [J]. Mol Cancer Ther, 2004,3(2):103.

[14] 孙玮,高飞,张利宁. 新的抑癌基因 PDCD4 最新研究进展 [J]. 药物分析杂志,2007,27(7):1138.

Glossy ganoderma spore oil promotes apoptosis of human lung adenocarcinoma SPC-A1 through downregulation of miR-21

ZHAO Guangfeng, GUO Wei, ZHAO Xiaoyin, WANG Yaping, HOU Yayi*
(Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of glossy ganoderma spore oil on the proliferation, apoptosis, expression of miR-21 and its target genes of human lung adenocarcinoma SPC-A1 cell line, and to explore its possible mechanism. **Method:** The SPC-A1 cells were treated with glossy ganoderma spore oil for 24 and 48 hours. The inhibition growth efficacy was determined using cell count kit (CCK-8). Cell morphological changes were observed by light microscopy. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of miR-21, PTEN and PDCD4 were determined by Real-time PCR. **Result:** Glossy ganoderma spore oil concentration-dependently inhibited the SPC-A1 cell's proliferation. When the concentration of glossy ganoderma spore oil attained to 0.2%, the cells' morphology changed obviously. Glossy ganoderma spore oil could induce the apoptosis of SPC-A1 cells at low concentration. Glossy ganoderma spore oil down-regulated the expression of miR-21 and up-regulated the expression of PTEN and PDCD4 significantly. **Conclusion:** glossy ganoderma spore oil could inhibit the proliferation obviously and cause the changes of cell morphology. Furthermore, glossy ganoderma spore oil induced apoptosis of SPC-A1 cell through down-regulating the expression of miR-21 and up-regulating tumor suppressors.

[Key words] SPC-A1; glossy ganoderma spore oil; apoptosis; miR-21; tumor suppressor

doi: 10.4268/cjcmm20110926

责任编辑 张宁宁