

灵芝孢子油对 MCF-7 细胞凋亡及迁移的影响

宋玉仙, 窦环, 刘贤钦, 公伟, 侯亚义

(南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 目的: 观察灵芝孢子油对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、迁移及凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: CCK-8 法检测灵芝孢子油对 MCF-7 增殖的影响; 伤口愈合实验观察灵芝孢子油对 MCF-7 细胞迁移的作用; 流式细胞术检测细胞凋亡率; RT-PCR 法检测抗凋亡基因 Bcl-2、促凋亡基因 Bax 及血管内皮生长因子(VEGF) mRNA 表达水平。结果: 不同浓度的灵芝孢子油对 MCF-7 的增殖和迁移均有一定程度的抑制作用, 且呈时间、剂量依赖性; 灵芝孢子油能显著诱导 MCF-7 细胞凋亡; RT-PCR 结果显示, 灵芝孢子油能上调 Bax 同时下调 Bcl-2 和 VEGF 的 mRNA 表达水平。结论: 灵芝孢子油能抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和迁移, 并促进细胞凋亡, 其作用机制可能与下调 VEGF 和 Bcl-2/Bax 的比值有关。

关键词: 灵芝孢子油; MCF-7 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2406(2011)02-0091-04

The Effects of *Ganoderma Lucidum* Spore Oil on MCF-7 Cell Apoptosis and Migration

SONG Yu-xian, DOU Huan, LIU Xian-qin, GONG Wei, HOU Ya-yi

(Immunology and Reproductive Biology Lab of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Objective: To observe the effects of *Ganoderma lucidum* spore oil on proliferation, apoptosis and migration of human breast cancer cell MCF-7 in vitro, and explore its possible mechanisms. Methods: The proliferation inhibition rate of MCF-7 cells was determined by using the cell count kit 8 (CCK-8). Wound healing assay was used to evaluate the cell migration. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Furthermore, to analyze the expression level of Bcl-2, Bax and VEGF mRNA, RT-PCR was performed. Results: Different concentrations of *Ganoderma lucidum* spore oil could inhibit MCF-7 cell proliferation as well as migration and took on dose and time dependently. It also induced cell apoptosis in a dose dependent way. The mRNA expressions of Bax related to apoptosis were increased, while Bcl-2 was decreased. On the other hand, the VEGF mRNA expression, which was important to tumor metastasis, was also declined. Conclusion: *Ganoderma lucidum* spore oil can inhibit MCF-7 cell proliferation and migration, on the other hand, it induces cell apoptosis. The mechanisms may be partly due to the decreased Bcl-2/Bax rate and VEGF mRNA expression.

Key words: *Ganoderma lucidum* spore oil; MCF-7 cell line; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell migration

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国中药宝库中特有的一味珍贵药材,在我国已有 2 000 多年的药用历史。

基金项目: 南京大学研究生科研创新基金(2010CL04)

作者简介: 宋玉仙(1986-),女,南京大学生命科学院药理学硕士。

通讯作者: 侯亚义(1960-),男,教授,博士研究生导师,主要从事肿瘤与免疫学研究。

收稿日期: 2010-09-20

修回日期: 2010-10-15

近年来,从灵芝的子实体、孢子和菌丝体所提取的三萜类、多糖类等化合物组分已被证实具有免疫调节、抗肿瘤、保肝等药理作用^[1-4]。灵芝孢子油是灵芝孢子粉中的脂溶性物质,它高度浓缩了灵芝孢子中的三萜类、多糖类、核苷类等有效成分,已有动物实验和临床研究证实,对肿瘤具有抑制和治疗作用^[5-6]。但灵芝孢子油是否具有诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡并抑制其迁移作用尚无研究报道。本实验观察灵芝孢子油对

MCF-7 凋亡及其迁移的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

灵芝孢子油(南京中科集团股份有限公司);人乳腺癌 MCF-7 细胞(中科院上海细胞库,由本实验室传代培养);DMEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所);Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(Biounique);RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MCF-7 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率

取处于指数生长期状态良好的细胞,以 1×10^4 个·孔⁻¹的密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,培养过夜。空白组:只加完全培养基,无细胞;溶剂对照组:含细胞和完全培养基;阳性对照组:加 10 μM 顺铂(DDP);实验组:分别加 0.25、0.5、1、2、4 μL·mL⁻¹ 灵芝孢子油(用完全培养基稀释)处理细胞,每个浓度设 5 个复孔。继续培养 24h 或 48h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 3h 后用酶标仪测定 450nm 处吸光值(OD),并按公式计算细胞抑制率。

抑制率(%) = $[(\text{对照组平均 OD} - \text{给药组平均 OD}) / (\text{对照组平均 OD} - \text{空白组平均 OD})] \times 100\%$

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

MCF-7 细胞按 1×10^5 个·孔⁻¹的密度接种于 24 孔板,过夜后分加 0.25、0.5、1、2 μL·mL⁻¹ 灵芝孢子油。继续培养 24h 后用不含 EDTA 的胰酶短暂消化收集细胞,PBS 洗两次(300g·min⁻¹ 离心 5min)。按 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书操作,最后用流式细胞仪检测细胞凋亡所占比率。

1.2.4 伤口愈合实验测细胞迁移^[7]

MCF-7 细胞以 2×10^5 个·孔⁻¹的密度接种于 12 孔板培养过夜,加入不同剂量灵芝孢子油后用 10 μl 枪头在孔里划一条线,使细胞间出现一条“伤口”。作用 0h、12h、24h 后于倒置显微镜下观察并拍照,用图像处理软件测量“伤口”的宽度。0h 与 12h、24h 的宽度之差视为细胞迁移的距离。

1.2.5 RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 及 VEGF mRNA 表达水平

MCF-7 以 5×10^5 个·孔⁻¹的密度接种于 12 孔板培养过夜,收集细胞,采用 Trizol 一步法提取总 RNA,用 smartspecTM plus spectrophotometer (BIO-RAD) 测量 RNA 浓度。取 1 μg RNA 做反转录,20 μl 反转录体系包括 4 μl 5 × RT buffer,2 μl dNTP,0.5 μl Oligo dT,0.5 μl RNase inhibitor,0.5 μl ReverTra Ace 和 DEPC 水至 20 μl。反应程序为 42℃ 20min,99℃ 5min,4℃ 5min。随后进行 PCR,20 μl 反应体系包括 1 μl RT 产物,0.5 μl 上游引物,0.5 μl 下游引物,10 μl 2 × Taq PCR MasterMix,1 μl DMSO,7 μl ddH₂O。Bcl-2 上游引物:5-AGCTGCACCTGACGCCCTTCACCGC-3,下游引物:5-GGAGAAATCAAACAGAG-3;Bax 上游引物:5-TGCTTCAGGTTTCATCCAGG-3,下游引物:5-GCCTTGAGC-ACCAGTTTG-3;VEGF 上游引物:5-AGCTGCACCTGACGCCCTTCACCGC-3,下游引物:5-AGGAGAAATCAAACAGAG-3;β-actin 上游引物:5-TCTGGCACCACACCTT-CTA-3,下游引物:5-AGGCATACAGGGACAGCAC-3。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像系统采集图片。

1.2.6 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5 软件对数据进行单因素方差分析,结果以平均值($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 灵芝孢子油抑制 MCF-7 细胞增殖

由图 1 可以看出,0.25~4 μL·mL⁻¹ 的灵芝孢子油作用组的 OD 值较对照组明显降低,其差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着孢子油浓度增加和作用时间的延长,其对细胞的抑制作用逐渐增强,即呈时间、剂量依赖性。作用 48h 后的 IC₅₀ 为 0.49 μL·mL⁻¹。

2.2 灵芝孢子油诱导 MCF-7 细胞凋亡

空白对照组的早期凋亡率为 0.68%,灵芝孢子油作用后,细胞早期凋亡率上升到 3.2%~5.31%,晚期凋亡和坏死的细胞数随浓度增加呈递增趋势。见图 2 (右下方为早期凋亡细胞,右上方为晚期凋亡和坏死细胞)。

2.3 灵芝孢子油抑制 MCF-7 细胞迁移

伤口愈合实验显示(如图 3),对照组细胞迁移能力强,伤口愈合快;灵芝孢子油作用组,随浓度增加迁移能力减弱,不利于伤口愈合,12h、24h 迁移距离与对照组相比均存在显著差异。

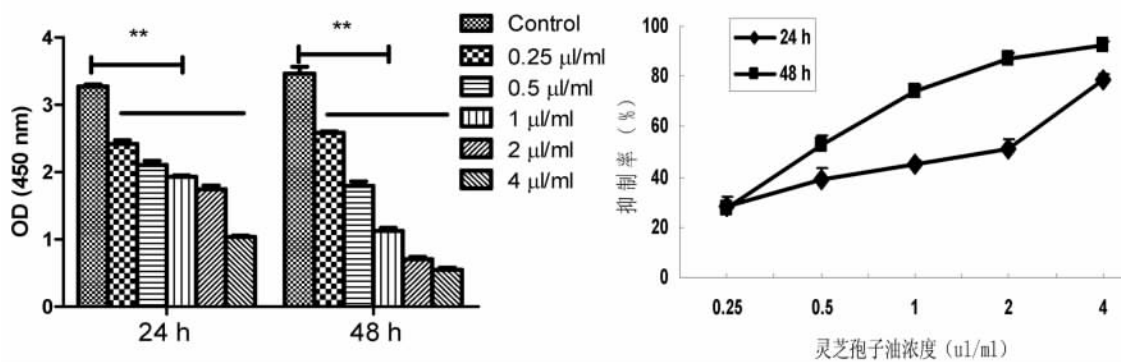


图 1 不同浓度灵芝孢子油作用 48h 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

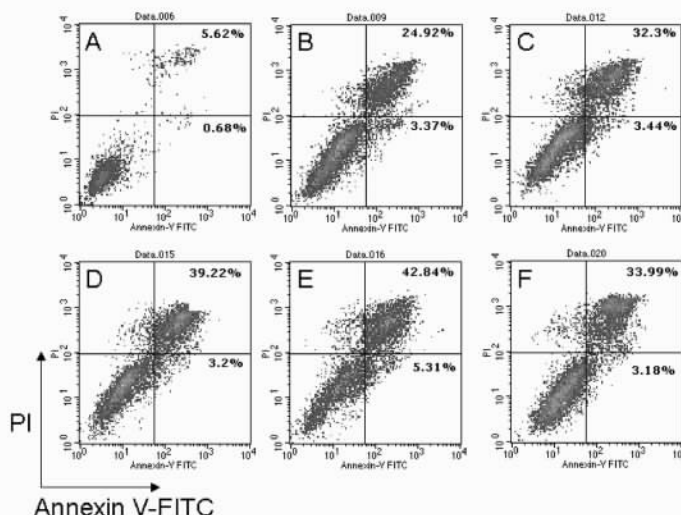


图 2 不同浓度灵芝孢子油作用 24 h 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

注: A control, B ~ E 分别为 $0.25 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灵芝孢子油, F 为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂。

2.4 灵芝孢子油对 Bcl-2、Bax 及 VEGF mRNA 表达的影响

Bcl-2/Bax 是一对凋亡相关基因,前者具有抗凋亡作用,而后者起促凋亡作用。实验发现,灵芝孢子油 $0.25, 1 \mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的 Bcl-2 mRNA 表达量(288bp)较对照组明显降低,与内参 β -actin(270bp)的相对表达量明显下降,而 Bax 的 mRNA 表达量(295bp)显著上调。VEGF 是肿瘤血管生成中的关键因素,可促进肿瘤细胞的浸润及迁移。如图 4 所示,灵芝孢子油作用下 VEGF 的 mRNA 表达量(240bp)略有下降。

3 讨论

灵芝在我国古医学文献中占有极其重要的地位,《神农本草经》、《本草纲目》均将其奉为“上药”,并对其广泛的药效和保健作用进行了详尽的描述。近年来,灵芝对肿瘤的抑制作用已得到广泛认可,而灵芝孢子油是灵芝发挥抑瘤作用的“主力”。灵芝孢子油集中了灵芝孢子中的三萜类、多糖类、核苷类等有效成分,是灵芝孢子中功效成分的集合体。

在灵芝孢子油抗肿瘤的研究中,已有文献报道,灵芝孢子油剂量依赖性抑制 Jacket 细胞增殖,促进细胞凋亡^[8]。本实验选择人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞作为研究对象,观察其体外抗肿瘤作用。实验结果表明,灵芝孢子油能有效促进 MCF-7 细胞凋亡,抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 水平显著下降,而促凋亡基因 Bax 的 mRNA 表达明显增加。另有研究发现,灵芝孢子油对 H_{22} 移植性癌细胞生长有抑制作用,可降低瘤细胞中血管生成调控基因 VEGF 的表达^[9]。在我们的实验中也发现,与对照组相比,灵芝孢子油作用组 VEGF 表达量有所下降。由于 VEGF 高水平表达与肿瘤形成、生长和转移关系密切^[10],我们又通过伤口愈合实验初步分析了肿瘤细胞的增殖和迁移能力,发现灵芝孢子油确实能有效抑制 MCF-7 细胞的增殖和迁移,并呈一定的时效量效关系。

综上所述,灵芝孢子油可明显抑制 MCF-7 细胞增殖,随着浓度增加、作用时间延长,其抑制作用增强;一定浓度的灵芝孢子油可诱导 MCF-7 细胞凋亡,其

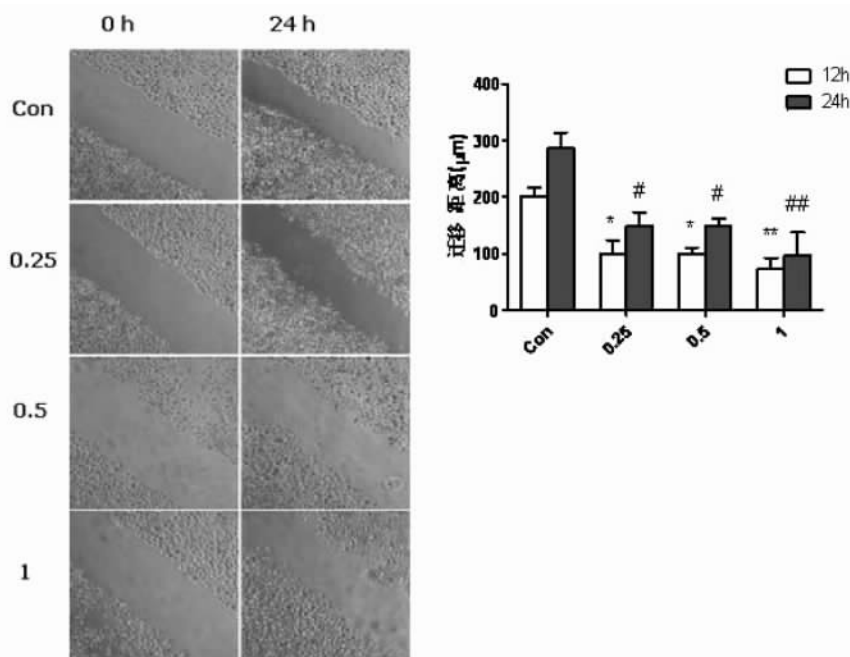


图3 不同浓度灵芝孢子油对 MCF-7 细胞迁移能力的影响

注:与空白组比较,12h* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白组比较,24h# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

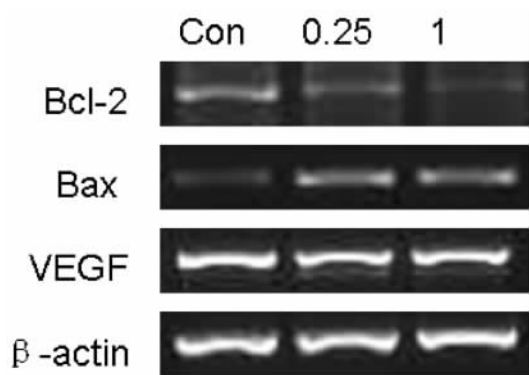


图4 不同浓度灵芝孢子油对 MCF-7 细胞内 Bcl-2、Bax 及 VEGF mRNA 表达的影响

机制可能与下调 Bcl-2 同时上调 Bax 表达有关;下调 VEGF 的表达可能是灵芝孢子油抑制肿瘤细胞迁移的机制之一,但更详细的机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang WY, Wang Y, Hou YY. Effects of Chinese medicinal fungus water extract (FWE) on tumor metastasis and some parameters of immune function [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(3) : 461 - 468.
- [2] 冯鹏,沈建,刘诚,等. 灵芝孢子多糖胶囊增强免疫力的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12) : 3039 - 3040.
- [3] Hu HB, A hn NS, Yang XL, et al. Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell [J]. Int J Cancer, 2002, 102(3) : 250 - 253.
- [4] 黄健康,王凤岩,黄琼,等. 灵芝孢子油增强小鼠免疫功能及护肝作用的实验研究 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(7) : 1272 - 1274.
- [5] 袁玉荪. 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] 贾红巧,吴世华,吴骏. 中药灵芝孢子油治疗前列腺癌的临床分析 [J]. 男科医学, 2005, 9(4) : 18 - 19.
- [7] Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, et al. A high - throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image - based readout methods [J]. BMC Biotechnol, 2004, 4(9) : 21 - 30.
- [8] 冯敏,朱锦龙,沈建,等. 灵芝孢子油诱导 Jurkat 细胞凋亡作用的研究 [J]. 亚太传统医药, 2005(2) : 161 - 163.
- [9] 卞嵩,许立,俞云,等. 灵芝孢子油对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长及瘤细胞 VEGF 表达的影响 [J]. 安徽医药, 2007, 11(12) : 1067 - 1068.
- [10] Barkefors S, Le Jan L, Jakobsson E, et al. Endothelial cell migration in stable gradients of vascular endothelial growth factor A and fibroblast growth factor 2: effects on chemotaxis and chemokinesis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(20) : 13905 - 13912.

欢迎邮购

《中医药信息》及《中医药学报》1995 ~ 2006 年合订本, 每年、每刊、每册订价: 20 元, 2007 ~ 2009 年每刊、每年、每册 45 元, 汇款至哈尔滨市香坊区和平路 24 号《中医药信息》编辑部即可。电话: 0451 - 82117809, 邮政编码: 150040, 款至即寄。