

云芝多糖对小鼠黑色素瘤 B16 细胞体外增殖和凋亡的影响及其机制^Δ

魏士杰^{1*}, 陈文强^{2#}(1. 陕西理工大学附属医院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4363-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.13

摘要 目的: 研究云芝多糖(CVP)对小鼠黑色素瘤 B16 细胞体外增殖、凋亡的影响及其机制。方法: 采用 MTT 法测定以二甲亚砜(DMSO, 阴性对照)和 0(空白对照)、0.156、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0 μg/ml CVP 分别培养细胞 48、72 h 后的细胞存活率, 计算半数抑制浓度(IC₅₀); 流式细胞术测定以 DMSO(阴性对照)和 0(空白对照)、0.5 μg/ml CVP 分别培养细胞 24、48、72 h 后的细胞凋亡率; 实时荧光定量聚合酶链式反应法测定以 DMSO(阴性对照)、0.5 μg/ml CVP 培养细胞 48、72 h 后细胞中凋亡相关基因 P53、Bcl-2、Fas mRNA 的表达。结果: 0.156~10.0 μg/ml CVP 对 B16 细胞的生长均有抑制作用, 并在 0.156~0.625 μg/ml 范围内呈浓度和时间依赖性, 培养 48、72 h 的 IC₅₀ 分别为(0.32±0.01)、(0.18±0.04) μg/ml。0.5 μg/ml CVP 培养细胞 24、48、72 h 后, 细胞凋亡率较阴性对照和空白对照均明显升高($P<0.01$); 0.5 μg/ml CVP 培养细胞 48、72 h 后, 细胞中 P53、Bcl-2、Fas mRNA 表达水平较阴性对照明显降低($P<0.01$)。结论: CVP 可抑制小鼠 B16 细胞的增殖并诱导其凋亡, 其机制可能与下调细胞中 P53、Bcl-2 和 Fas 基因的表达有关。

关键词 云芝多糖; 黑色素瘤 B16 细胞; 增殖; 凋亡; 体外

Effects of *Coriolus versicolor* Polysaccharides on Proliferation and Apoptosis of Murine Melanoma B16 Cell *in vitro* and Its Mechanism of Action

WEI Shijie¹, CHEN Wenqiang²(1. Center Hospital Affiliated to Shaanxi Sci-Tech University, Shaanxi Hanzhong 723000, China; 2. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-Tech University, Shaanxi Hanzhong 723000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of *Coriolus versicolor* polysaccharides (CVP) on *in vitro* proliferation and apoptosis of murine melanoma B16 cell and its mechanism. **METHODS:** MTT assay was used to determine the survival rate of murine melanoma B16 cell after cultured with DMSO (negative control), 0 (blank control), 0.156, 0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0 μg/ml CVP for 48, 72 h, and the IC₅₀ was calculated. Flow cytometry was used to determine the apoptotic rate of murine melanoma B16 cell after cultured with DMSO (negative control), 0 (blank control), 0.5 μg/ml CVP for 24, 48, 72 h. Quantitation Real-time PCR (qRT-PCR) was used to determine the mRNA expression of cell apoptosis-related gene P53, Bcl-2 and Fas in murine melanoma B16 cell after cultured with DMSO (negative control), 0.5 μg/ml CVP for 48, 72 h. **RESULTS:** 0.156-10.0 μg/ml CVP could inhibit the growth of B16 cells, in concentration and time-dependent manner within 0.156-0.625 μg/ml; IC₅₀ of B16 cells after cultured for 48 and 72 h were (0.32±0.01), (0.18±0.04) μg/ml. After cultured with 0.5 μg/ml CVP for 24, 48, 72 h, apoptotic rates of B16 cells were increased significantly, compared to negative control and blank control ($P<0.01$). After cultured with 0.5 μg/ml CVP for 48, 72 h, mRNA expression of P53, Bcl-2 and Fas were decreased significantly, compared to negative control ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** CVP can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of B16 cells, the mechanism of which may be associated with the expression down-regulation of P53, Bcl-2 and Fas gene.

KEYWORDS *Coriolus versicolor* polysaccharides; Murine melanoma B16 cell; Proliferation; Apoptosis; *in vitro*

[2] 杨秀英. 盆腔炎致病因素 100 例分析[J]. 中外医疗, 2009, 28(20): 2.

[3] 孔熙. 左氧氟沙星联合替硝唑治疗盆腔炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(14): 1 536.

[4] 黄丽, 孙培文, 罗隽, 等. 慢性盆腔炎模型的建立与评价

Δ 基金项目: 陕西省“13115”科技创新工程计划项目(No. 2008 ZDGC-04)

* 主治医师。研究方向: 药用真菌对肿瘤细胞的影响。E-mail: 448347936@qq.com

通信作者: 教授。研究方向: 药用真菌资源的开发和利用。电话: 0916-2642832。E-mail: wenqiangc@126.com

[J]. 中南药学, 2010, 8(6): 469.

[5] 颜永芽, 周燕文, 石全, 等. 盐酸左氧氟沙星片人体药动学及生物等效性研究[J]. 中国药房, 2008, 19(26): 2 033.

[6] 刘朝晖, 廖秦平. 盆腔炎性疾病致病微生物及治疗方案研究[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(7): 522.

[7] 黄华民. 盐酸左氧氟沙星在盆腔炎治疗中的临床疗效及安全性评估[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(7): 989.

[8] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组. 盆腔炎性疾病诊治规范: 草案[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(7): 556.

(收稿日期: 2016-06-02 修回日期: 2016-06-27)

(编辑: 邹丽娟)

云芝为多孔菌科真菌彩绒革盖菌[*Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel]的干燥子实体,是我国传统的药用真菌,被广泛用于癌症和免疫缺陷等疾病的治疗^[1]。云芝子实体或菌丝体提取液经注射或口服给药后对胃癌、结肠癌、食管癌、乳腺癌、肺癌等多种实体瘤的生长均有明显抑制作用^[2-3]。云芝多糖(*Coriolus versicolor* polysaccharides, CVP),在中国也称云芝糖肽(Polysaccharide peptide, PSP),在日本多称云芝多糖(Polysaccharide krestin, PSK),是从云芝子实体或培养的菌丝体中提取的具有多种药理作用的多糖类物质^[4]。CVP是云芝子实体中的主要活性成分,也是天然多糖的典型代表,具有直接抑制肿瘤细胞生长的作用^[5]。真菌子实体和菌丝体代表了真菌的不同发育阶段,两者体内多糖的相对分子质量不同,结构也有差异^[6],推测其抗肿瘤的作用也有不同。目前报道的有关CVP的抗肿瘤研究也多以菌丝体多糖为研究对象^[7]。在中国传统中医药中,云芝子实体是多类中药产品的原料,子实体多糖是中药制剂或产品的主要成分之一,具有广泛的免疫调节和抗肿瘤作用,子实体多糖有潜力开发成为抗肿瘤药物,但目前尚未见其用于抗小鼠黑色素瘤B16细胞株研究的相关报道。鉴于此,本研究以野生云芝子实体为研究对象,通过提取并纯化制得CVP,考察其对小鼠黑色素瘤B16细胞株增殖和凋亡的影响,并初步探讨其作用机制,以期为进一步研究和临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

0408-2型台式低速离心机(上海医疗器械集团有限公司手术器械厂);ABI 7500 Fast型实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国应用生物系统公司);FACS Calibur™型流式细胞仪(美国BD Biosciences公司);Multiskan™型全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司)。

1.2 药材与试剂

野生云芝子实体购自陕西省汉中市汉台区药材市场,由陕西省食药菌工程技术研究中心邓百万教授鉴定为多孔菌科真菌彩绒革盖菌[*Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel]的干燥子实体。胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);二甲基亚砜(DMSO)、MTT(美国Sigma公司);Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司,批号:BC28KA1892);动物组织/细胞RNA提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:40134);宝生物染料法荧光定量试剂盒(上海皓嘉科技发展有限公司,批号:AK8006);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞株

小鼠黑色素瘤B16细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

2 方法

2.1 CVP的提取与精制

准确称取野生云芝粉末50.0 g,用95%乙醇在80℃条件下水浴40 min脱脂,收集药渣,风干。脱脂后的云芝粉末加入适量蒸馏水,超声30 min,抽滤,重复超声提取1次,弃去药渣,合并2次提取液。将提取液减压浓缩至原体积的1/4后,用2

倍体积95%乙醇边搅动边沉淀,即得粗多糖,计算出多糖得率(多糖沉淀干质量/云芝子实体干质量×100%)为7.74%。将粗多糖经过Sevage法去除蛋白及利用活性炭脱色后^[8]得精制多糖,经苯酚-硫酸法^[9]测定其葡聚糖含量为54.69%。

2.2 细胞培养

将小鼠黑色素瘤B16细胞培养在含10%热灭活FBS和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中。待细胞生长至70%~80%融合时,吸弃细胞培养液,加入1~2 ml 0.25%胰酶溶液消化3~5 min,用新鲜培养液收集细胞悬液,然后转移至离心管中,以1 000×g离心3 min,收集细胞沉淀,用新鲜RPMI 1640培养基重悬细胞。将细胞悬液与培养液按1:4的比例混合后转接至3个100 mm培养皿中,每皿加10 ml培养液,振荡均匀后,将培养皿放入37℃、5% CO₂孵箱中培养。

2.3 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞体外增殖的影响

采用MTT法测定细胞活性。将处于对数生长期的小鼠黑色素瘤B16细胞以1×10⁴个细胞/孔的密度种植于含100 μl培养液的96孔板中,培养24 h。弃去50 μl培养液后再分别加入0(空白对照)、0.156、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5.0、10.0 μg/ml CVP和等体积的DMSO溶液(阴性对照),然后用培养液调整体积至100 μl,每个质量浓度设置3个重复孔。培养48、72 h后于各孔细胞中分别加入30 μl MTT溶液(5 mg/ml),继续培养4 h,吸弃各组细胞的培养液并加入100 μl DMSO进行溶解,振荡器上充分振荡后,在570 nm波长下用全波长酶标仪测定光密度(OD)值。细胞增殖抑制率(%)=用药组平均OD值/阴性对照组平均OD值×100%,细胞存活率(%)=1-细胞增殖抑制率。以细胞存活率对CVP对数进行直线回归和统计处理,并采用加权直线回归法计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.4 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞体外凋亡的影响

采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。将处于对数生长期的小鼠黑色素瘤B16细胞按1×10⁴个/孔的密度接种于含100 μl培养液的96孔板中,分别加入0(空白对照)、0.5 μg/ml的CVP和等体积的DMSO溶液(阴性对照)培养细胞24、48、72 h后,70%乙醇4℃固定细胞24 h,然后加入0.1 mg/ml核糖核酸酶A(RNase A)37℃消化30 min,取出放入冰水中,用0.5 ml碘化丙啶(PI,50 μg/ml)4℃避光染色1 h,用流式细胞仪进行分析。PI标记的流式细胞技术分析时,在G₁峰左侧出现亚G₁期(Sub-G₁)峰或A峰(或称凋亡峰),其峰值高低反映了细胞发生凋亡的比例。

2.5 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞中凋亡相关基因表达的影响

采用RT-PCR法分析凋亡相关基因的表达。按“2.4”项下方法培养细胞,48 h后收集细胞,提取细胞总RNA,采用TIANGEN快速反转录预混试剂(KR108)进行反转录,RT-PCR使用宝生物染料法荧光定量试剂盒进行。以1 μg cDNA为模板扩增细胞凋亡相关基因P53(GenBank登录号:NM_000546)、Bcl-2(GenBank登录号:NM_000633)和Fas(GenBank登录号:NM_152876),以β-actin基因(GenBank登录号:NM_001101)为内参。P53引物序列:上游为5'-GCGCAGAGGAAGAGAATCTCCGC-3',下游为5'-GGCCAACTTGTTCAGTGGAGCCCCGG-3',产物大小为502 bp;Bcl-2引物

序列:上游为5'-GCGTCAACCGGAGATGTCGCCCTG-3',下游为5'-TTTCTTAAACAGCCTGCAGCTTTGTTT-3',产物大小为349 bp; Fas引物序列:上游为5'-AGTACAGAAA-CATGCAGAAAGCAC-3',下游为5'-CTCTGCAAGAGTCAAAGATTGGCT-3',产物大小为343 bp; β -actin上游为5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCAAGGCG-3',下游为5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTCCC-3',产物大小为540 bp。反应体系: SYBR premix EX Taq II 10 μ l, 上、下游引物各0.4 μ l, 染料0.4 μ l, cDNA模板2 μ l, 加水至20 μ l。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C, 90 s; 94 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 40个循环。基因的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析^[10], 以DMSO对照样品中P53、Bcl-2和Fas基因的相对表达量标准化为100%, CVP处理样品的相对表达量即可通过公式计算。每组数据重复测定3次, 求出标准差。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞增殖的抑制作用

CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞的增殖具有较强的抑制作用, 在0.156~0.625 μ g/ml范围内其抑制作用呈现明显的浓度和时间依赖性。当CVP质量浓度大于0.625 μ g/ml时, 其对细胞的抑制作用进入平台期。作用48、72 h的 IC_{50} 分别为(0.32 \pm 0.01)、(0.18 \pm 0.04) μ g/ml。CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞增殖的影响结果见图1。

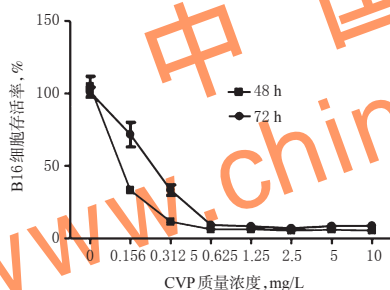


图1 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞增殖的影响结果

Fig 1 Effects of CVP on the proliferation of murine melanoma B16 cell

3.2 CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞凋亡的抑制作用

与空白对照组和阴性对照组比较, 0.5 μ g/ml CVP组细胞的凋亡率随培养时间的延长而升高, 作用48、72 h后细胞的凋亡率达到66.95%、75.40%, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。培养不同时间后各组细胞凋亡率测定结果见表1, 流式细胞图见图2。

表1 培养不同时间后各组细胞凋亡率测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 The apoptotic rate of cells in each group after cultured for different time($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.93 \pm 0.18	0.74 \pm 0.27	0.35 \pm 0.22
阴性对照组	1.21 \pm 0.25	0.64 \pm 0.28	0.40 \pm 0.33
CVP组	6.93 \pm 0.50*	66.95 \pm 0.65*	75.40 \pm 0.41*

注: 与空白对照组、阴性对照组比较, * $P<0.01$

Note: vs. blank control group and negative control group, * $P<0.01$

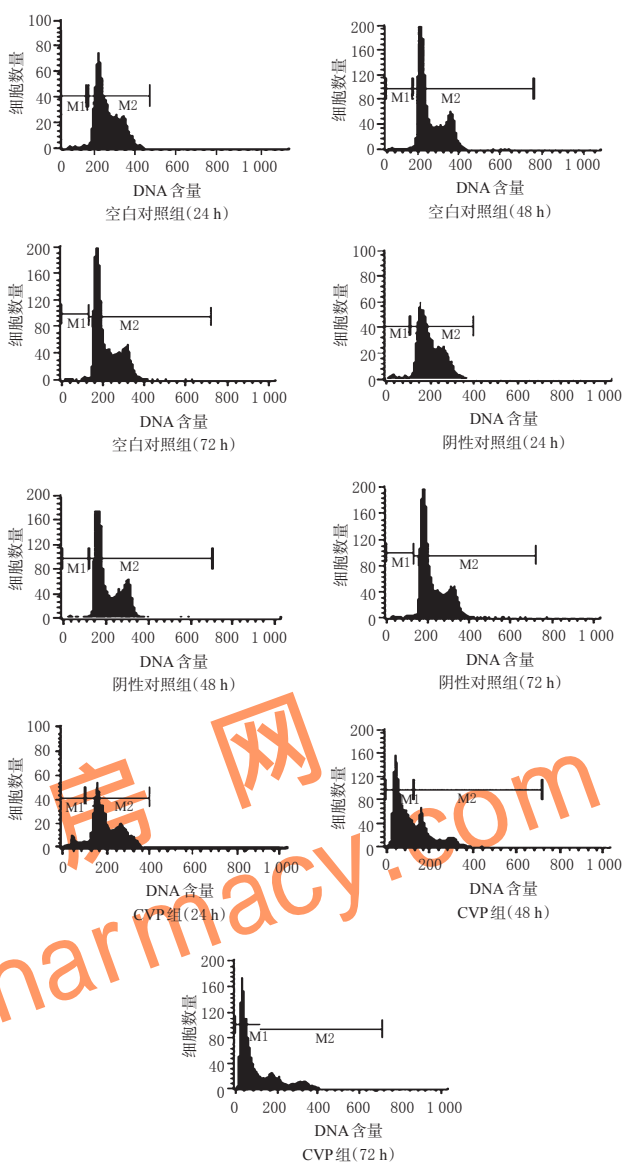


图2 培养不同时间后各组细胞凋亡的流式细胞图

Fig 2 Flow cytometry of cell apoptosis after cultured for different time

3.3 CVP对凋亡相关基因表达量的影响

培养48 h后, 与阴性对照组比较, CVP组小鼠细胞中P53、Bcl-2和Fas mRNA表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 培养72 h后, CVP组小鼠黑色素瘤B16细胞中P53、Fas mRNA表达水平较培养48 h后继续降低, Fas mRNA水平略有升高, 但均显著低于阴性对照组($P<0.01$)。细胞中凋亡相关基因P53、Bcl-2和Fas mRNA表达水平测定结果见图3。

4 讨论

恶性黑色素瘤(Malignant melanoma)是一类起源于神经嵴的黑色素细胞、极易发生转移的恶性肿瘤, 由于其恶性程度高、预后差, 近年来已成为发病率增长最快的恶性肿瘤之一^[11-12]。因此寻找敏感性高、作用靶点多的有效药物一直是肿瘤研究学者关注的热点。有研究显示, 云芝菌丝体多糖具有较强的抑制小鼠黑色素瘤细胞B16的作用, 且其对该细胞的抑制作用明显高于其他肿瘤细胞^[12]。因此, 从云芝子实体中提取多糖用于临床治疗黑色素瘤B16的候选药物具有重要的意义。本研

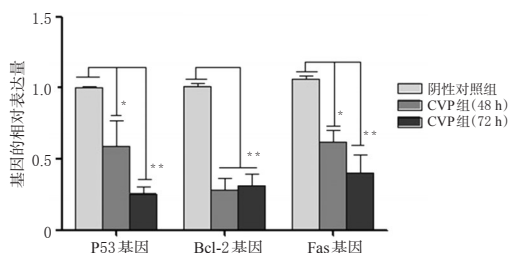


图3 各组细胞中凋亡相关基因P53、Bcl-2和Fas mRNA表达测定结果

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Fig 3 The mRNA expression of P53, Bcl-2 and Fas of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

究结果显示,CVP作用于B16细胞48、72 h后的 IC_{50} 分别为 (0.32 ± 0.01) 、 (0.18 ± 0.04) $\mu\text{g/ml}$,该结果说明CVP对小鼠黑色素瘤B16细胞具有较强抑制活性。笔者据CVP的 IC_{50} 值以及前人的研究结果^[12-13],选取 $0.5 \mu\text{g/ml}$ CVP进行细胞凋亡的检测。结果显示,在这一质量浓度下,作用48 h后凋亡细胞的比例为66.95%,72 h后为75.4%,与空白对照组和阴性对照组比较凋亡率显著升高。

细胞凋亡的发生主要有2条信号通路介导,一条是通过线粒体的信号通路,另一条是通过Fas/FasL及TNF/TNFR死亡受体通路。目前研究认为肿瘤的发生、发展均与细胞凋亡相关^[14]。在线粒体通路中,Bcl-2家族成员发挥着重要作用,是目前研究最多的一类细胞凋亡调控蛋白因子,属于一种抗凋亡蛋白;P53是定位于线粒体上的转录因子,能与促凋亡蛋白Bak等直接作用,解除促凋亡蛋白Bak与抗凋亡蛋白Bcl-2的相互作用,进而改变线粒体的通透性,诱导细胞凋亡;Fas基因是凋亡信号基因,其基因产物Fas蛋白是一种细胞凋亡信号受体,属于死亡受体通路。本实验通过表达谱分析发现,CVP可以下调小鼠黑色素瘤B16细胞中Bcl-2和P53基因的表达,且随着CVP作用时间的延长,其对P53基因的下调作用越明显,而对Bcl-2基因的下调则达到了平衡,这说明CVP可通过调节Bcl-2和P53基因的表达来诱导小鼠黑色素瘤B16细胞株的凋亡。同时发现死亡受体中的Fas基因表达也被CVP下调,说明着2条通路都参与CVP所致的小鼠黑色素瘤B16细胞株的凋亡。

综上所述,CVP能通过诱导细胞凋亡的方式抑制小鼠黑色素瘤B16细胞的生长,其作用机制可能与下调细胞中P53、Bcl-2和Fas基因的表达相关。

参考文献

[1] 张俊,吴超.云芝多糖对机体细胞因子影响的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(10):263.
[2] Luo KW, Yue GG, Ko CH, *et al.* In vivo and in vitro an-

ti-tumor and anti-metastasis effects of Coriolus versicolor aqueous extract on mouse mammary 4T1 carcinoma[J]. *Phytomedicine*,2014,21(8/9):1 078.

[3] Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, *et al.* Polysaccharide K and Coriolus versicolor extracts for lung cancer: a systematic review [J]. *Integr Cancer Ther*,2015,14(3):201.
[4] Sakagami H, Aoki T, Simpson A, *et al.* Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK:review[J]. *Anticancer Res*,1990,11(2):993.
[5] Cui J, Chisti Y. Polysaccharopeptides of Coriolus versicolor: physiological activity, uses, and production [J]. *Bio-technol Adv*,2003,21(2):109.
[6] 张劲松,韩炜玮,潘迎捷.云芝子实体多糖(CVP)化学结构研究Ⅲ[J].菌物系统,2001,20(4):531.
[7] Dong Y, Kwan CY, Chen ZN, *et al.* Antitumor effects of a refined polysaccharide peptide fraction isolated from Coriolus versicolor: in vitro and in vivo studies[J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*,1996,92(2):140.
[8] 雷迎,陈宝,王茂茂,等.云芝多糖提取工艺的优化及其性能研究[J].食品科技,2011,36(11):169.
[9] 李辉,罗佳波.苯酚-硫酸法测定的围乐颗粒中总多糖的含量[J].中国药房,2008,19(9):685.
[10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method[J]. *Methods*,2001,25(4):402.
[11] Pacheco I, Buzea C, Tron V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma[J]. *Expert Rev Mol Med*,2011,13(13):461.
[12] Harhaji Lj, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D, *et al.* Anti-tumor effect of Coriolus versicolor methanol extract against mouse B16 melanoma cells: in vitro and in vivo study[J]. *Food Chem Toxicol*,2008,46(5):1 825.
[13] Ho CY, Kim CF, Leung KN, *et al.* Differential anti-tumor activity of Coriolus versicolor (Yunzhi) extract through p53- and/or Bcl-2-dependent apoptotic pathway in human breast cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*,2005,4(6):638.
[14] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*,2000,407(6 805):770.

(收稿日期:2016-01-04 修回日期:2016-07-22)

(编辑:林 静)