

灵芝多糖对 NB4 细胞凋亡及 Egr-1 表达的影响

李广远, 杨雅丽, 李海龙, 楚惠媛, 李雪燕, 陈 彻, 王 晶(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 研究灵芝多糖在体外对人类白血病细胞株 NB4 细胞的增殖抑制及凋亡的影响及抗肿瘤的机制。**方法** 用 MTT 比色法检测灵芝多糖对 NB4 细胞增殖的抑制作用, Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 NB4 细胞的凋亡情况, 荧光定量 PCR 及蛋白印迹技术检测早期生长反应因子 1(Egr-1) 基因的表达。**结果** 灵芝多糖对 NB4 细胞增殖具有抑制作用并可促其凋亡, 最高分别为 33.5% 及 18.77%。这种效应呈时间-剂量依赖性。与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。对 Egr-1 mRNA 和蛋白表达也具有明显的促进作用, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 灵芝多糖在体外能够抑制 NB4 细胞的增殖并促其凋亡, 其机制可能与上调 Egr-1 的表达相关。

关键词: 灵芝多糖; 急性白血病; 凋亡; Egr-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0476-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.012

Effect of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on Apoptosis and Egr-1 Expression in NB4 Cells

LI Guangyuan, YANG Yali, LI Hailong, CHU Huiyuan, LI Xueyan, CHEN Che, WANG Jing(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLP) on the proliferation and apoptosis of human acute promyelocytic leukemia NB4 cells *in vitro*, and to explore the possible anti-tumor mechanism. **Methods** The inhibitory effects of GLP on the proliferation of NB4 cells were measured by using MTT assay. The labeled Annexin V-FITC/PI and flow cytometry were used to detect the apoptotic cells. The expression levels of Egr-1 mRNA and protein were evaluated by fluorescent quantitation PCR and Western blotting, respectively. **Results** GLP inhibited the proliferation of NB4 cells and promoted its apoptosis *in vitro*, and the rate being 33.5 %, 18.77 % respectively. The effect was time- and dose-dependent ($P < 0.01$ compared with the control group). The expression levels of Egr-1 mRNA and protein were also significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** GLP can inhibit the proliferation of NB4 cells and promoted its apoptosis *in vitro*, and the mechanism could be related to up-regulation of Egr-1 expression.

Keywords: *Ganoderma lucidum* polysaccharides; Acute promyelocytic leukemia; Apoptosis; Egr-1

白血病(Leukemia)是造血系统的恶性肿瘤,具有复杂多变的临床特征。目前治疗仍以化疗为主。灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst] 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌,在我国已有两千多年的用药历史,具有滋补强身、扶正固本等功效,被《本经》称为上品。现代药理学研究发现灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharide, GLP)是灵芝的主要有效成分之一,众多研究提示灵芝多糖具有抗肿瘤的作用^[1]。

有文献报道灵芝多糖在体外无直接抑瘤和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[2],可能是通过体内免疫调节而达到抗肿瘤的目的^[3]。上述结果主要来自于灵芝多糖抗实体肿瘤的研究,而针对急性白血病方面的研究鲜有报道。因此,本实验选择急性早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia, APL) NB4 细胞株作为研究对象,探索灵芝多糖对其在体外增殖以及凋亡的影响并探讨可能的分子机制。

收稿日期: 2013-05-14

作者简介: 李广远,男,副教授,研究方向: 中医基础理论及中医养生康复等研究。Email: 414023578@qq.com。通讯作者: 王晶,副教授,医学博士,研究方向: 血液肿瘤的诊治与防治。Email: 252993594@qq.com。

基金项目: 甘肃省教育厅基金项目(044B-05)。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂 人 APL 细胞株 NB4 细胞, 南京生物制品研究所; 灵芝多糖 (GLPS), 福州绿谷生物药业技术研究所分离提取 (批号: 1931880), 溶于 RPMI 1640 液, 过滤除菌, 置 4 °C 冰箱保存备用, 使用前用 RPMI 1640 液稀释成不同浓度。RPMI 1640 (批号: 307964) 和胎牛血清 (批号: 0799), 美国 GIBCO 公司; MTT (批号: 0231)、DMSO (批号: 0793), 美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒 (KGA107), 南京凯基生物公司; 兔抗大鼠 Egr-1 单克隆抗体和辣根酶标记多克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司; ERK 及 p-ERK (p44/42) 抗体试剂盒, 美国 Cell-signaling 公司; 蛋白定量试剂盒, Biorad 公司。CO₂ 孵箱, 上海跃进医疗器械厂; 流式细胞仪, COULTER 公司; 5700 荧光定量 PCR 仪, PE 公司。

1.2 细胞培养 NB4 细胞接种于含 100 mL·L⁻¹ 胎牛血清, 青、链霉素各 100 U·mL⁻¹ 的 RPMI 1640 培养液中, 置 37 °C、饱和湿度、5 % CO₂ 孵箱中培养, 每 2~3 d 换液传代培养。

1.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期 NB4 细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL (另设不加细胞的只加培养基的空白调零孔), 实验组分别加入 5 种不同浓度的 GLPS (依据预实验确定为 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹), 对照组不加药给予 RPMI 1640 培养液, 每组 6 个复孔, 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中培养。于 24 h, 48 h, 72 h 及 96 h, 每孔加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 液 10 μL。继续培养 4 h, 1000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液, 每孔加入 10 % 的 DMSO 150 μL, 振荡 10 min, 用酶标仪在 490 nm 波长、空白孔调零, 测定吸光度 (A) 值, 按下面公式计算细胞生长抑制率。

抑制率 (IR) = (1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100 %。

1.4 Annexin V-FITC /PI 双染色法检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞进行实验, 将 NB4 细胞以 5 × 10⁵·mL⁻¹ 密度接种于 24 孔板内, 设置对照孔。每孔培养总体积为 1 mL。依据 MTT 结果选择终浓度为 200 mg·L⁻¹ GLPS 分别处理 24 h、48 h 及 72 h 后收集细胞, 加入上样管, PBS 洗涤细胞 2 次 (1000 r·min⁻¹ 离心 3 min), 调整细胞数量为 5 × 10⁵ 个, 在各管中加入 500 μL 的 Binding buffer 重悬细胞, 然后加入 5 μL Annexin V-FITC, 混匀后, 再加入 5 μL PI, 混匀。室温避光反应 15 min, 1 h 内在流式细胞仪上进行检测。以 Annexin V (+)/PI (-) 判断为凋亡。

1.5 荧光定量 PCR 检测 Egr-1 基因 RNAiso Reagent 提取总 RNA, 采用荧光染料 (SYBR Green I) 标记的荧光定量 PCR (FQ-PCR) 技术, 设内参照 (β-actin; 上游引物为 CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT, 下游引物为 ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA), 检测 Egr-1 基因高特异性引物 (上游引物为 AAAGTTTGCCAGGAGCGATG, 下游引物为 CAGGGGATGGGTATGAGGTG)。FQ-PCR 反应体系 20 μL, 含 2.5 × Real Master Mix 8 μL, 20 × SYBR Green I 1 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL (50 ~ 100 ng 总 RNA 逆转录产物)。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 40 s 和 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环, 于每个循环延伸结束后, 以 SINGLE 方式检测 F1 通道的荧光强度。

1.6 Western blot 法检测 Egr-1 蛋白 分别离心收集各组细胞, 冰 PBS 洗两次, 加入细胞裂解液 50 ~ 100 μL, 冰上裂解 20 min, 采用 BCA 蛋白测定法检测蛋白质浓度, 每一样品取 20 μg, 以 5 : 1 的体积与 2 × SDS 加样缓冲液混合, 100 °C 加热 3 ~ 5 min, 样品经 10 % SDS-PAGE 胶电泳分离, 然后转至硝酸纤维素膜上, 5 % 的脱脂牛奶室温封闭 3 h, TBST 洗膜 3 次, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入 1 : 1000 二抗室温孵育 30 ~ 60 min, ECL 发光法检测蛋白表达, 压片, 电脑扫描保存。

1.7 统计学处理方法 采用单因素方差分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两两比较用 SNK-q 检验, 检验水准为 P = 0.05。用 SPSS13.0 统计软件进行统计处理。

2 结果

2.1 GLPS 对 NB4 细胞增殖抑制作用 见表 1。不同浓度的 GLPS 对体外培养的 NB4 细胞增殖具有直接抑制作用。当 GLPS 浓度为 25 mg·L⁻¹ 时, 各时间段对 NB4 细胞增殖呈轻度抑制, 与对照组比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); 当 GLPS 浓度达到 50 mg·L⁻¹ 及以上时, GLPS 可明显抑制 NB4 细胞增殖, 呈剂量 - 时间依赖性。与对照组比较, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。

2.2 GLPS 诱导 NB4 细胞凋亡的作用 见图 1。Annexin V-FITC /PI 双染色法检测结果显示, GLPS 具有诱导 NB4 细胞凋亡的作用。随作用时间的增加, 细胞凋亡率逐渐升高。

2.3 GLPS 诱导 NB4 细胞 Egr-1 mRNA 的表达 见图 2。荧光定量 PCR 结果显示, GLPS (200 mg·L⁻¹) 作

表1 GLPS 对 NB4 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 The effect of GLPS on growth of NB4 cells

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h		96 h	
		A value	IR / %	A value	IR / %	A value	IR / %	A value	IR / %
对照组		0.312 ± 0.006		0.423 ± 0.015		0.573 ± 0.008		0.597 ± 0.011	
GLPS 组	25	0.309 ± 0.016	1.0	0.407 ± 0.011	3.8	0.550 ± 0.021	4.0	0.578 ± 0.013	3.2
	50	0.301 ± 0.012	3.5	0.401 ± 0.019	5.2	0.522 ± 0.008*	8.9	0.527 ± 0.017*	11.7
	100	0.291 ± 0.010*	6.7	0.370 ± 0.017*	12.5	0.460 ± 0.013*	19.7	0.455 ± 0.014*	23.8
	200	0.274 ± 0.015*	12.2	0.333 ± 0.012*	21.2	0.398 ± 0.014*	30.5	0.403 ± 0.021*	32.5
	400	0.265 ± 0.010*	15.1	0.310 ± 0.013*	26.7	0.381 ± 0.012*	33.5	0.410 ± 0.017*	31.3

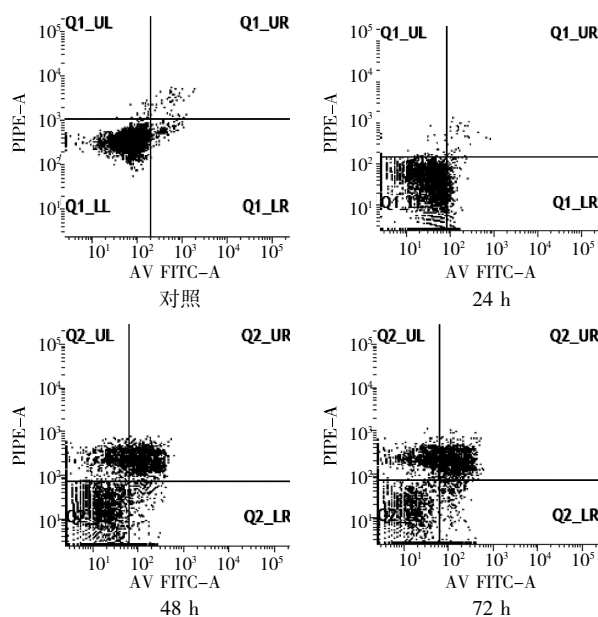
注: 与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

图1 GLPS 对NB4 细胞凋亡的影响

Figure 1 The effect of GLPS on apoptosis of NB4 cells

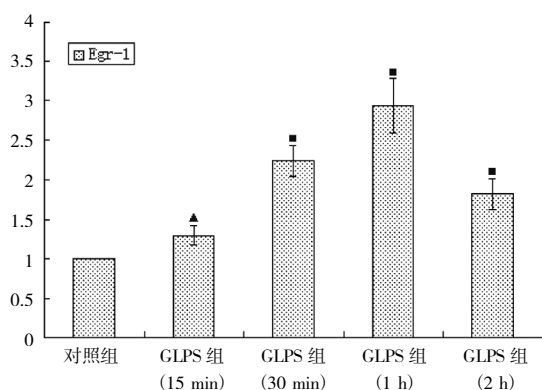


图2 GLPS 对 NB4 细胞 Egr-1 mRNA 表达的影响

(▲ $P < 0.05$, ■ $P < 0.01$)

Figure 2 The effect of GLPS on Egr-1 mRNA expression of NB4 cells

用于 NB4 细胞 15 min 时 Egr-1 mRNA 的表达开始升高, 于 1 h 表达量达到高峰, 与对照组比较, 差异有

统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 GLPS 诱导 NB4 细胞 Egr-1 蛋白的表达 见图 3。GLPS 可上调 NB4 细胞 Egr-1 蛋白水平, 其表达规律与 Egr-1 mRNA 表达相似。

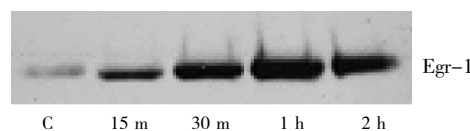


图3 GLPS 作用于 NB4 细胞后 Egr-1 蛋白表达

Figure 3 The effect of GLPS on Egr-1 protein expression of NB4 cells

3 讨论

已有研究^[4]表明, GLPS 主要是通过诱导细胞因子如白介素与肿瘤坏死因子, 促进淋巴细胞的增殖和巨噬细胞的吞噬功能等提高体内机体免疫力的方式杀伤肿瘤细胞或诱导其凋亡。

本研究表明, GLPS 可在体外直接抑制急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞的增殖并促其凋亡, 但对 NB4 细胞增殖的抑制率及促凋亡率并不高, 最高分别为 33.5 % 及 18.77 %。然而值得注意的是, GLPS 可直接诱导早期生长反应因子 1 (Early growth response factor-1, Egr-1) 基因的表达。作为一种重要的核转录因子, Egr-1 参与了细胞的分化与增殖, 通过调节下游的靶基因(如 TGF- β 、cyclin D₁、c-jun、PTEN、p53 和 p21 等)执行抑癌的功能^[5-6]。

有证据显示, Egr-1 在多种人类恶性肿瘤细胞中低表达, 甚至消失, 其表达量与癌症患者的生存期密切相关^[7-9]。而促进 Egr-1 表达可以增强肿瘤对化疗药物及放射治疗的敏感性^[10-13]。因此, 尽管 GLPS 直接抑制 NB4 细胞增殖及促其凋亡的效率并不高, 但很可能在化疗药物的减毒增效方面起到良好的协同效应。一些研究也间接支持了这一效应^[14-15]。然而对此

领域的系统认识,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李晓冰,赵宏艳,郭栋. 灵芝多糖药理学研究进展[J]. 中成药, 2012, 34(2): 332-335.
- [2] 张群豪,於东晖,林志彬. 用血清药理学方法研究灵芝浸膏 GLE 的抗肿瘤作用机制[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32 (3): 210-213.
- [3] Sun LX, Lin ZB, Li XJ, et al. Promoting effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on B16F10 cells to activate lymphocytes [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 108(3): 149-154.
- [4] Huang FH, Shang MH, Xiong YT, et al. Antitumor Activity and Mechanism in vivo of Low-Molecular Weight Polysaccharides from Ganoderma lucidum[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, (3): 114-118.
- [5] Baron V, Adamson ED, Calogero A, et al. The transcription factor Egr-1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGF- β 1, PTEN, p53, and fibronectin [J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13: 115-124.
- [6] Ragione FD, Cucciolla V, Criniti V, et al. p21Cip1 gene expression is modulated by Egr-1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect[J]. Biol Chem, 2003, 278: 23360-23368.
- [7] Mittelbronn M, Harter P, Warth A, et al. EGR-1 is regulated by N-methyl-D-aspartate-receptor stimulation and associated with patient survival in human high grade astrocytomas[J]. Brain Pathol, 2009, 19: 195-204.
- [8] Yoshida Y, Nakada M, Sugimoto N, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival[J]. Int J Cancer, 2010, 126: 2341-2352.
- [9] Calogero A, Porcellini A, Lombardi V, et al. Sensitivity to cisplatin in primary cell lines derived from human glioma correlates with levels of EGR-1 expression[J]. Cancer Cell International, 2011, 11: 5.
- [10] 崔文,胡建莉,孔灵玲,等. 上调 EGR-1 表达对乳腺癌多柔比星耐药细胞的化疗增敏作用[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(10): 744-747.
- [11] Lopez CA, Kimchi ET, Mauceri HJ, et al. Chemoinducible gene therapy: A strategy to enhance doxorubicin antitumor activity[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(9): 1167-1175.
- [12] 李洪佳,于洪洋,原浩,等. Egr-1 基因与肿瘤腺癌放射敏感性关系的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 28(12): 5411-5414.
- [13] Gitenay D, Baron VT. Is EGR-1 a potential target for prostate cancer therapy? [J]. Future Oncol, 2009, 5(7): 993-1003.
- [14] 曲红光,高磊,贺丹,等. 灵芝多糖逆转卵巢癌细胞株顺铂耐药的作用及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(2): 250-254.
- [15] 梁曾恩妮,易有金,郭雨桐,等. 灵芝多糖联合 5-FU 对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 食品科学, 2012, 33 (19): 321-312.

(编辑: 邓响潮)

加减知柏地黄丸拮抗抑那通诱导小鼠特发性性早熟的实验研究

刘孟渊¹, 徐 雯², 肖柳英¹, 韩 超¹ (1. 广州市中医中药研究所, 广东 广州 510130; 2. 广州市中医医院, 广东 广州 510130)

摘要: **目的** 观察加减知柏地黄丸对抑那通诱导的小鼠特发性中枢性性早熟(ICPP)的影响。**方法** 选用日龄 18 d 的 BALB/c 雌性小鼠,随机分为 5 组:正常对照组,ICPP 模型组,加减知柏地黄丸高、低剂量组,甲地孕酮组。除正常对照组外,其他各组均给予外源性促性腺激素释放激素类似物抑那通复制 ICPP 模型,并给予不同的药物干预后检测各组小鼠阴道开口数、体质量、血清雌二醇(E₂)及黄体生成素(LH)水平,测定子宫、卵巢质量,计算子宫指数和卵巢指数,做子宫和阴道脱落细胞涂片,观察卵巢组织病理学变化等。**结果** 加减知柏地黄丸高剂量组于造模第 2~6 天对阴道开口提前有抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),而低剂量组于造模第 2~4 天对抑那通所致阴道开口提前有抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),甲地孕酮组仅于造模第 3 天对阴道开口提前有抑制作用($P < 0.05$);加减知柏地黄丸高剂量组和甲地孕酮组均可降低子宫和卵巢质量、子宫指数和卵巢指数($P < 0.01$),加减知柏地黄丸低剂量组可降低子宫质量增加及子宫指数和卵巢指数($P < 0.05$);加减知柏地

收稿日期: 2013-04-17

作者简介: 刘孟渊,女,主任医师,教授,硕士研究生导师。研究方向:中西医结合科研以及中医风湿病和疑难杂病的临床治疗。Email: mymyliu@sina.cn。通讯作者: 徐雯,主任中医师,硕士生导师。研究方向:儿童性早熟的中医治疗。Email: xuwenlaoshi@sina.com。

基金项目: 广东省中医药管理局项目(101039)。