

去壁灵芝孢子粉水溶成分抑制头颈鳞癌细胞增殖及转移

吴向平¹, 太乙迪², 王 嫣², 张 彬¹

摘要 目的 探讨去壁灵芝孢子粉水溶成分(A-GSP)在头颈鳞癌细胞中的生物学作用。**方法** 利用MTS法检测A-GSP在头颈鳞癌细胞系SCC15和SCC25中的细胞活力。采用平板克隆、划痕愈合实验和穿室实验探究A-GSP对头颈鳞癌细胞增殖、转移能力的影响。通过流式分析试剂盒检测A-GSP对头颈鳞癌细胞凋亡能力和细胞周期分布的影响。免疫蛋白印迹法检测A-GSP处理后上皮间质转化(EMT)分

子和细胞周期蛋白的表达变化。**结果** A-GSP作用后,头颈鳞癌细胞的增殖能力减弱($F = 62.72, P < 0.0001$),转移能力下降($F = 95.7, P < 0.0001$),细胞凋亡能力增加($F = 87.65, P < 0.0001$),G2/M期停滞($F = 15.31, P < 0.01$)。此外,A-GSP处理导致上皮细胞标志物E-cadherin上调,间质细胞标志物Vimentin、N-cadherin、Snail、Slug下调,细胞周期激酶CDK1下调,P21和P27上调,但是,并未引起凋亡通路蛋白Caspase和Bax水平改变。**结论** A-GSP通过诱导细胞周期G2/M期停滞和抑制EMT从而抑制头颈鳞癌细胞的增殖转移。

关键词 去壁灵芝孢子粉水溶成分;头颈鳞癌;细胞周期;上皮间质转化

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1434-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.002

2023-08-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82173152)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科,合肥 230022

²教育部重点实验室,北京大学肿瘤医院分子肿瘤学实验室,北京 100142

作者简介:吴向平,女,硕士研究生;

张 彬,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: 0065610719@bjmu.edu.cn

头颈鳞癌全球每年发病人数已超108万例,对

Role of inflammation induced by the novel immunosuppressant caerulomycin A in kidney injury

Shan Runrun¹, Yu Jutao², Xie Manman¹, Luo Xiufeng¹, Xie Chunya¹, Cui Zongyu³, Liu Xiaoying¹, Chen Qi¹
(¹College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Second Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of high concentration of Caerulomycin A (Cae A) on HK2 in renal tubular epithelial cells and to explore the role of cytoplasmic nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) in this process. **Methods** The effect of different concentrations of Cae A on the viability of HK2 cells was determined by MTT; the expression of kidney injury molecule (KIM-1) and NLRP3 was detected by real-time quantitative PCR, Western blot and immunofluorescence, while the effect of Cae A on the mRNA expression of IL-1 β , IL-18, IL-33, MCP-1, TNF- α was also measured by real-time quantitative PCR. HK2 cells were divided into control group, high concentration of Cae A group and high concentration of Cae A plus NLRP3 inhibitor CY-09 group, and the expression of KIM-1 and NLRP3 protein was detected by Western blot. **Results** The results of MTT showed that high concentration of Cae A could inhibit HK2 cell viability. Real-time quantitative PCR, Western blot and immunofluorescence assays showed that high concentration of Cae A upregulated the expression of KIM-1 and NLRP3, as well as the mRNA levels of IL-1 β , IL-18, IL-33, MCP-1, TNF- α , while CY-09 could down-regulate the expression of NLRP3 and KIM-1. **Conclusion** High concentration of Cae A significantly inhibited the viability of HK2 cells and induced damage and inflammatory response to HK2 with some nephrotoxicity that might be achieved via NLRP3 pathway.

Key words caerulomycin A; cellular damage; cellular inflammation; drug nephrotoxicity

于晚期患者,全身化疗是临床指南推荐的一线治疗方式^[1]。然而化疗带来的副反应使多数患者不耐受和不响应仍需解决。

灵芝在各类中医药收藏宝典里被列为上等名贵药材,在补充机体营养物质和疾病治疗方面也得到了我国传统医学实践的验证。灵芝孢子含有蛋白质,多糖,三萜,核苷类和微量元素,其药用功效相当于灵芝母体的75倍^[2]。近些年来,人们通过对孢子进行各种方式破壁,以破坏外层硬壳释放内部精华成分。体内、外实验均表明灵芝提取物可抑制多种肿瘤细胞的增殖,包括乳腺癌、结直肠癌、肺癌、肝癌^[3-6],但对头颈鳞癌细胞的生物学作用未被报道。因此,需要进一步被探究。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SCC15 和 SCC25 细胞购自北京协和细胞库(北京)。灵芝孢子粉由浙江寿仙谷医药股份有限公司提供。抗体 E-cadherin、P27、Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase8、Cleaved-caspase9、Bax、CDK1 均购自 Cell Signaling Technology (美国)、抗体 P21、N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug 均购自 SANTA (美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 所有的细胞培养基均使用高糖 DMEM (Hyclone, 美国)。培养箱环境 37 °C, 95% 湿度, 5% CO₂。

1.2.2 溶液配制 灵芝孢子粉储备液配制: 将一袋 1 g 灵芝孢子粉溶于 25 ml DMEM 培养基, 细胞超声仪功率 135 W 超声振荡 1 h。

1.2.3 MTS 实验 配备 MTS 试剂, 每孔 100 μl, 用 PBS 将 MTS 试剂稀释到 10%, 即 MTS : PBS = 1 : 9, 避光。弃去上层培养基。各孔滴加 100 μl MTS 使用液, 避光孵育 1 h。待孵育时间结束后测定 OD 值, 波长调整至 490 nm。

1.2.4 平板克隆形成实验 各组接种 2 000 个细胞。大约 10 d 可观察到细胞生长成群落状时, 不再继续培养。弃掉孔板内上层培养基。打入 1.5 ml 甲醇, 放置 15 min。弃掉, 每孔重新加入 1 ml 结晶紫。1 h 后将结晶紫回收入瓶, 清水洗涤孔板 2 到 3 遍直到不再残存多余结晶紫。

1.2.5 划痕愈合实验 待细胞长满后, 用 200 μl 枪头朝下并保持竖直方向, 力度均匀, 在孔中央笔直画线。PBS 彻底洗涤 2 到 3 次。随后使用无血清 DMEM 培养。在规定时间内对同一区域进行拍照。

1.2.6 Transwell 转移实验 细胞计数, 上室加 50 万个细胞。配备好 20% FBS 的 DMEM 培养基, 向下室加 700 μl。12 h 后, 弃掉上清。将小室底部浸泡在结晶紫染液里, 染色 1h。镊子夹取小室, 用清水浸洗小室。

1.2.7 流式细胞凋亡检测 收集 5×10^5 个细胞。各组加入 195 μl FITC 结合液。吸取 2 μl V-FITC, 加到其中一个单染管里。用 10 μl 移液器吸取 2 μl PI 加到另外一管。加药组用 PBS 离心洗涤。样本检测组每管加入 2 μl Annexin V-FITC 和 2 μl PI。室温孵育 10 min。

1.2.8 流式细胞周期检测 加入 750 μl 冰冷的无水乙醇, 使每管细胞都处于 75% 的乙醇浓度当中。上下颠倒振荡, 4 °C 保存过夜。离心后弃掉乙醇溶液。加入少量 PBS, 离心 1 次。弃 PBS, 每管加入 100 μl PI/RNase 染色液, 小心吹打。室温孵育 20 min。上机并用 Modfit 软件模拟检测结果。

1.2.9 Western blot 首先提取各组蛋白并调整浓度。先以 90 V 电压电泳, 压齐可调成 120 V, 1 h 跑分离胶。电流 300 mA, 冰上转膜 1 h 30 min。3% 牛奶封闭 1 h。一抗封闭旋转 4 度过夜。吸除一抗后, 加入适量 PBST 缓慢摇动 10 min, 重复 3 次。配制二抗, 封闭摇晃 1 h, PBST 洗膜 3 次。滴加发光液曝光。

1.3 统计学处理 使用 Image J 软件统计细胞克隆形成的数量和细胞迁移率, 对 Transwell 穿室成功的细胞进行计数; 使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对四组间均数进行单因素方差分析, 当各组间差异有统计学意义时, 使用独立样本 *t* 检验处理两组间均数。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A-GSP 在头颈鳞癌细胞系中的 IC₅₀ 运用 MTS 试剂检测 A-GSP 处理后的细胞活力, 并计算各时间段的 IC₅₀。发现癌细胞活力经 A-GSP 处理后呈浓度依赖性减低, 且呈时间依赖性。

2.2 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞自我增殖的影响 2 周后, 低浓度处理组细胞集落形成数量明显减少, 克隆形成体积也相应减小。说明 A-GSP 抑制了头颈鳞癌细胞的自我更新能力 ($F = 62.72, P < 0.0001$), 见图 2。

2.3 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞迁移能力的影响 使用不同浓度组的 A-GSP 处理细胞, 分别在 12 h、24 h 观察细胞迁移情况。结果显示处理组细

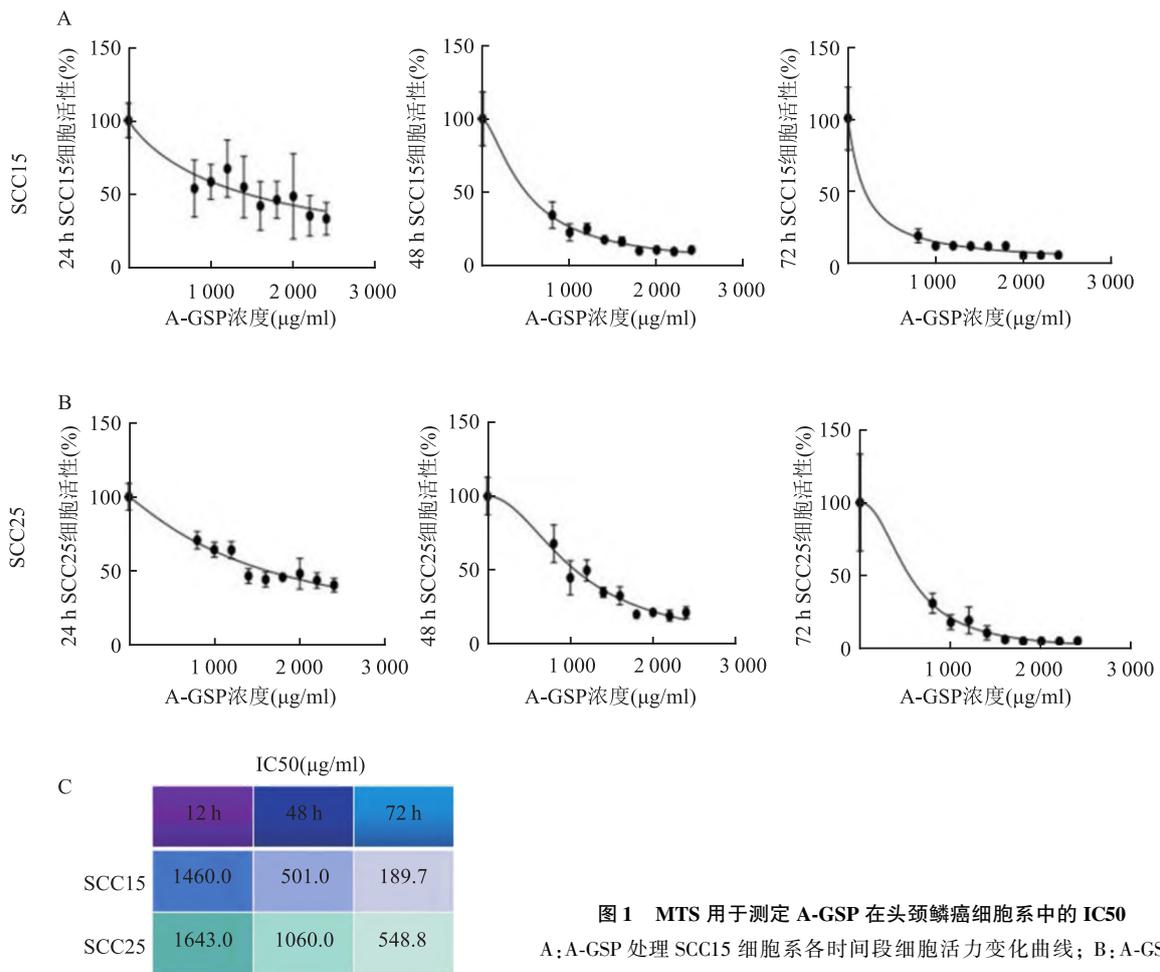


图1 MTS 用于测定 A-GSP 在头颈鳞癌细胞系中的 IC50
A: A-GSP 处理 SCC15 细胞系各时间段细胞活力变化曲线; B: A-GSP 处理 SCC25 细胞系细胞活力变化曲线; C: IC50 计算值

胞迁移率受到了明显的抑制 ($F = 13.347, P < 0.01$), 见图 3。

2.4 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞转移的影响

通过 Transwell 实验进一步验证 A-GSP 对肿瘤细胞迁移能力的影响, 结果显示 A-GSP 组穿室的细胞数量少于未处理组 ($F = 95.7, P < 0.0001$), 见图 4。

2.5 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞凋亡的影响

流式分析显示 A-GSP 使早、晚期凋亡比例均增加, 表明 A-GSP 可诱导头颈鳞癌细胞凋亡 ($F = 87.65, P < 0.0001$), 见图 5。

2.6 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞周期分布的影响

相比对照组, 经过药物作用后, G2/M 期细胞比例增加, 提示细胞周期被 A-GSP 中断在 G2/M 期 ($F = 15.31, P < 0.01$), 见图 6。

2.7 A-GSP 影响 SCC15 和 SCC25 细胞周期 G2/M 期蛋白的表达

72 h 后, Western blot 检测发现 A-GSP 能使 G2/M 期促进蛋白 CDK1 表达降低, G2/M

期抑制蛋白 P21 和 P27 表达增高。

2.8 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞 EMT 相关蛋白的表达影响

通过 Western blot 检测发现, E-cadherin 经药物作用后显著上调。同时, N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug 这几种间质细胞标志物蛋白在 A-GSP 组中表达下调, 提示 A-GSP 可抑制 EMT。

2.9 A-GSP 对凋亡相关蛋白的表达影响

此外, 课题组发现促凋亡蛋白 Bax 表达没有增强。其它促凋亡蛋白 Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase8、Cleaved-caspase9 也没有出现表达上调, 这提示 A-GSP 诱导 SCC15 和 SCC25 细胞发生凋亡不依赖于经典 Caspase 途径和 Bax 信号途径。

3 讨论

全球头颈鳞癌的发病率近十年来总体处于增长趋势。研究^[3, 7]表明, 灵芝孢子粉能有效控制晚期结直肠癌的病程进展, 对乳腺癌和非小细胞肺癌也具有潜在抵抗作用。本课题着重探究 A-GSP 对头

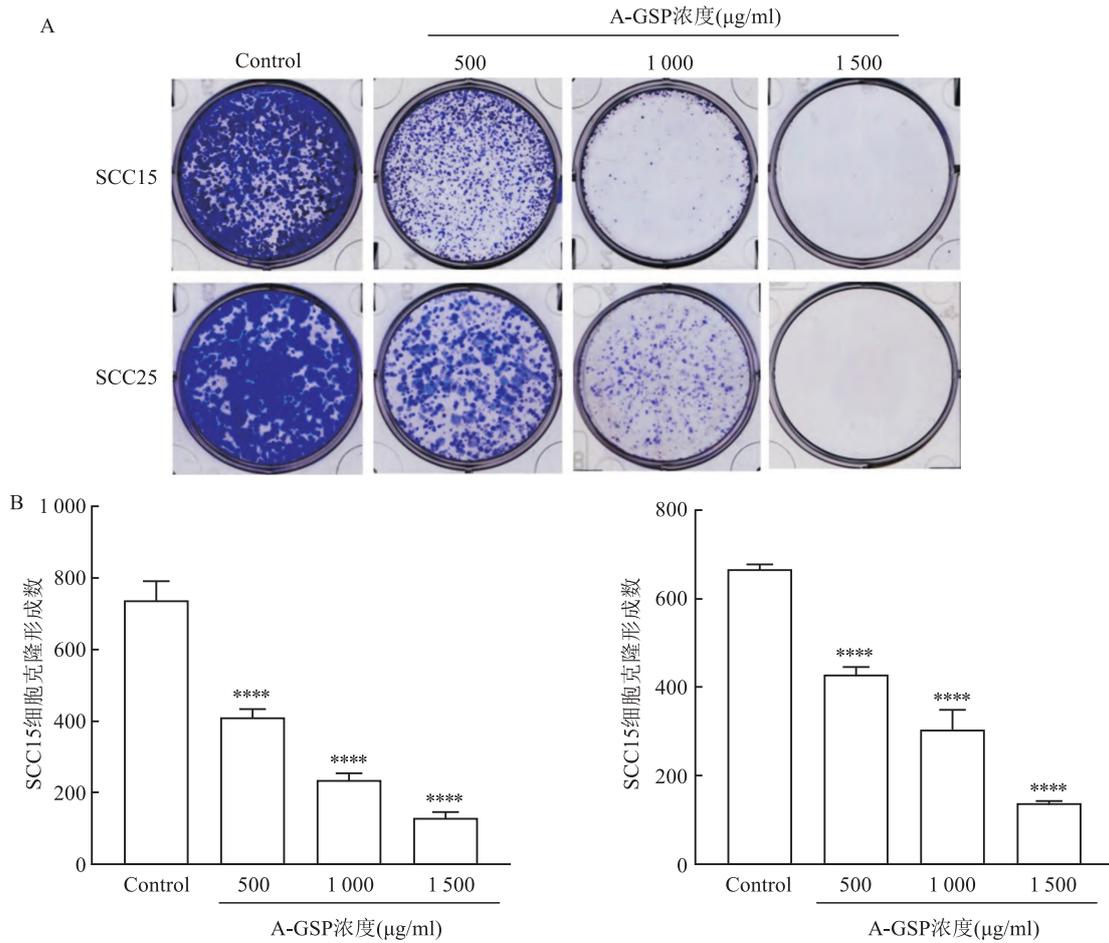


图2 A-GSP降低头颈鳞癌细胞自我更新能力

A:不同浓度 A-GSP 处理 SCC15 和 SCC25 细胞克隆形成图片; B:验收克隆结果并作出相应统计图;与 Control 比较: **** $P < 0.0001$

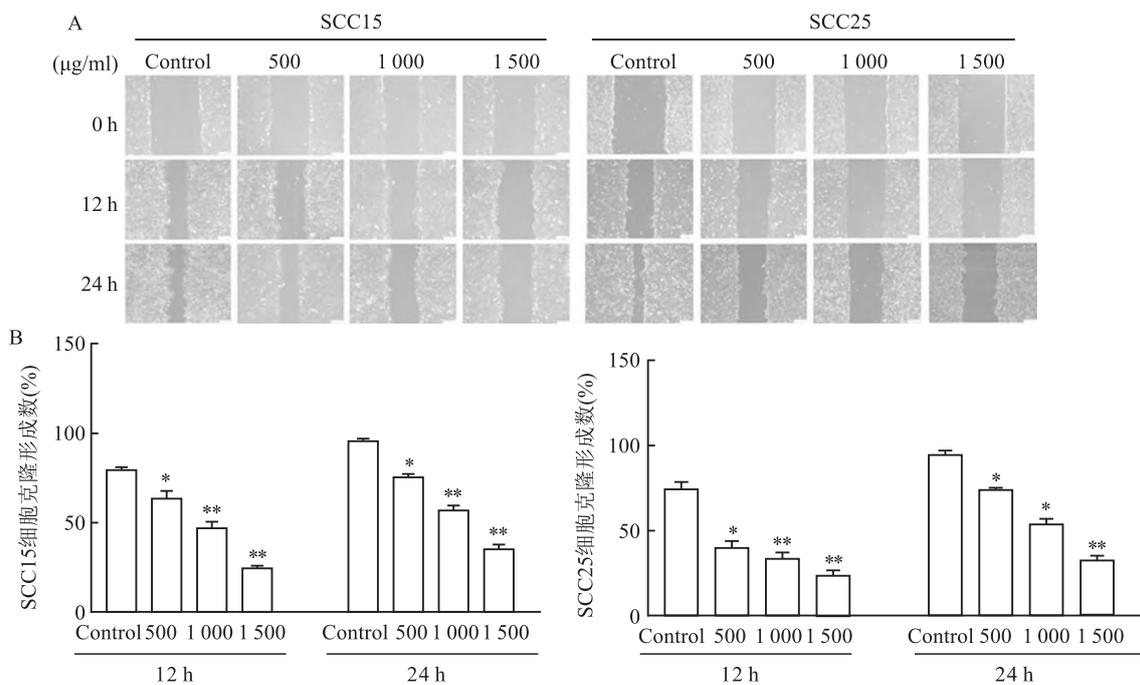


图3 A-GSP对 SCC15 和 SCC25 细胞迁移率的影响

A:不同条件各时间点细胞爬行的变化 $\times 10$; B:对不同浓度 A-GSP 处理细胞迁移率的统计学分析;与 Control 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

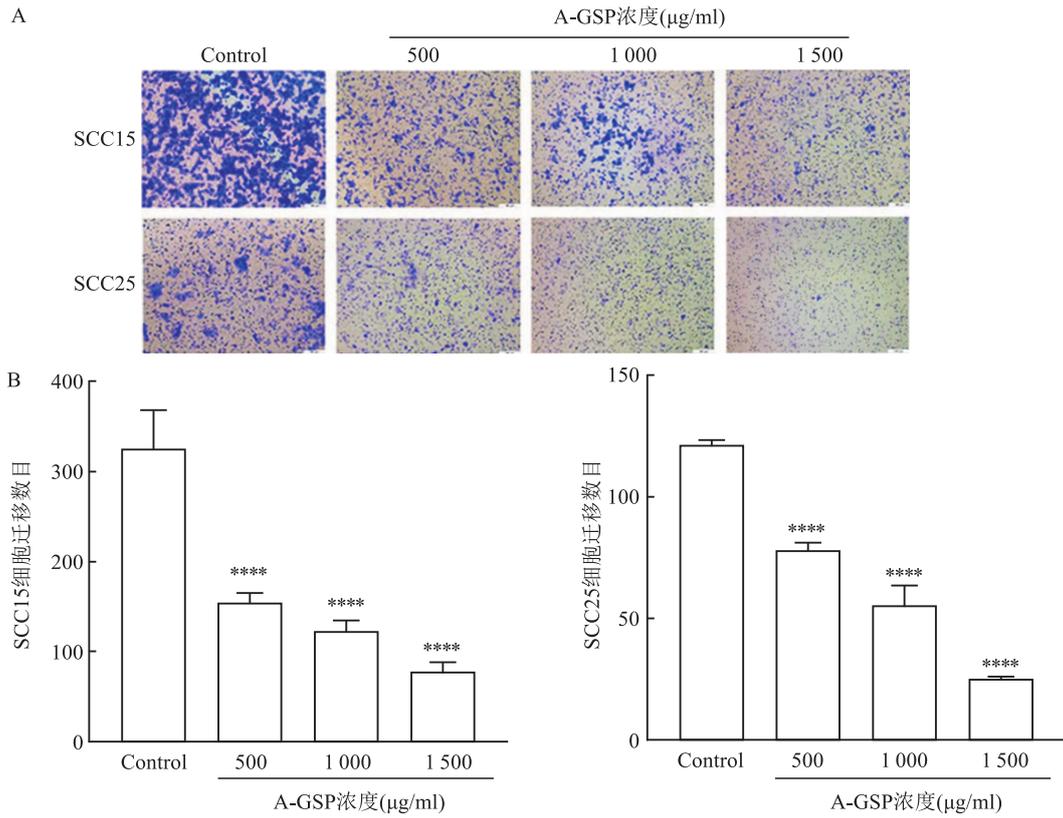


图4 A-GSP 减弱头颈鳞癌细胞的迁移能力

A:不同处理条件下肿瘤细胞穿室的图片 10; B:对不同浓度下细胞迁移数目的统计图;与 Control 比较:*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

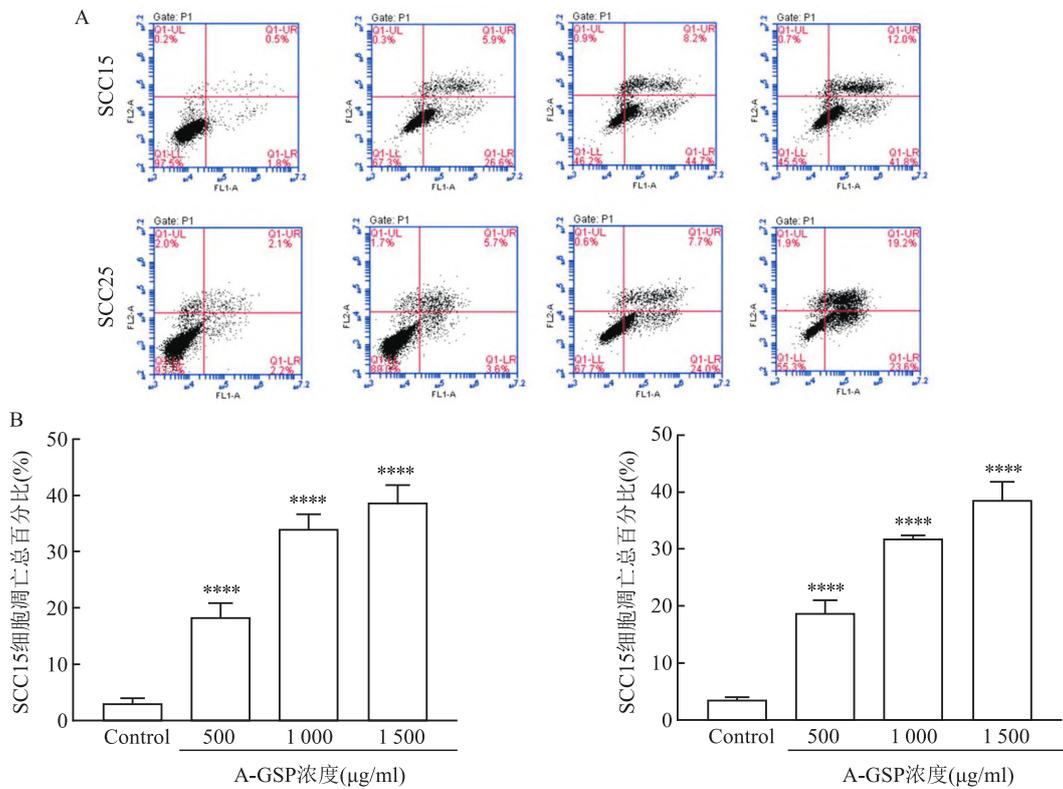


图5 A-GSP 对头颈鳞癌细胞凋亡能力的影响

A:药物处理 72 h 后流式分析检测细胞的凋亡比例; B:对药物处理后凋亡变化的统计结果;与 Control 比较:*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

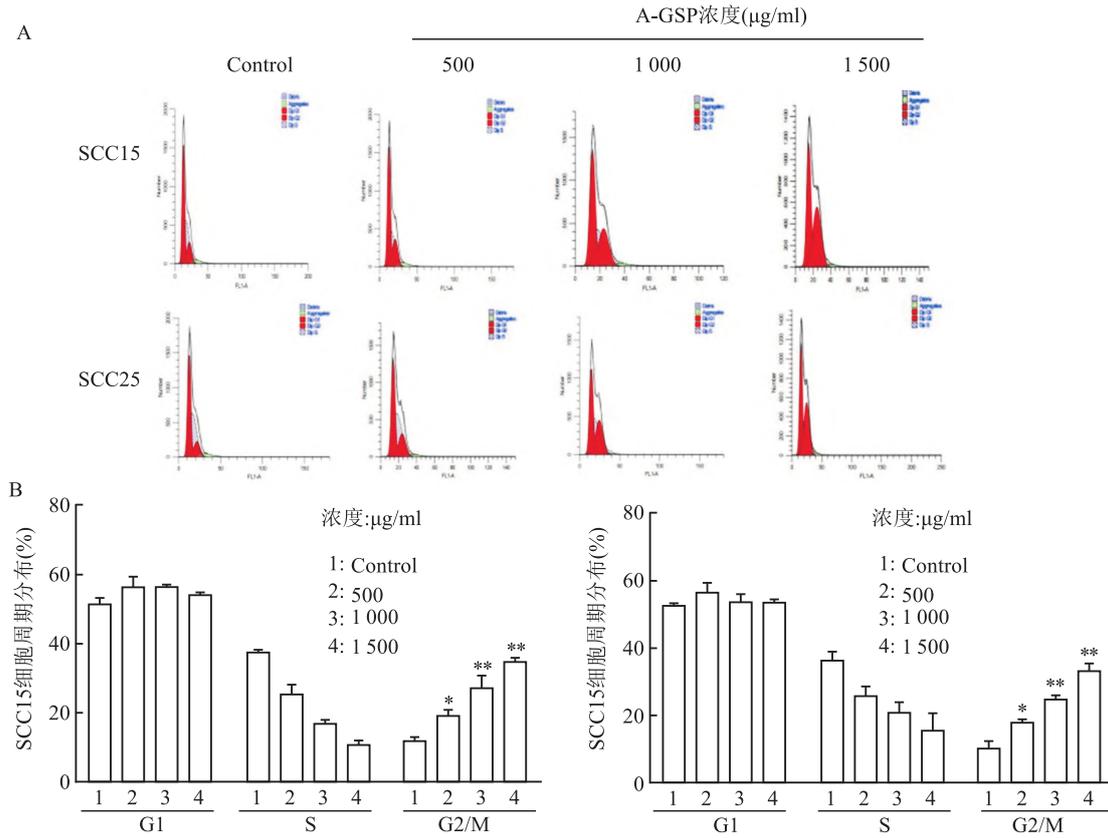


图6 A-GSP 中断头颈鳞癌细胞周期进程

A: 不同条件下细胞周期分布的流式分析图; B: 对细胞周期分布变化的统计学处理; 与 Control 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

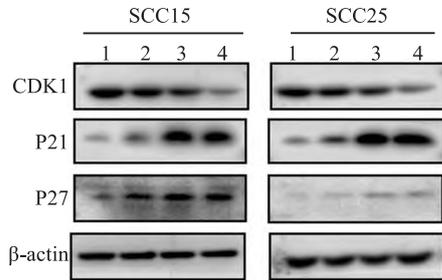


图7 A-GSP 对 G2/M 期相关蛋白的表达影响

1: Control; 2: 500 µg/ml; 3: 1 000 µg/ml; 4: 1 500 µg/ml

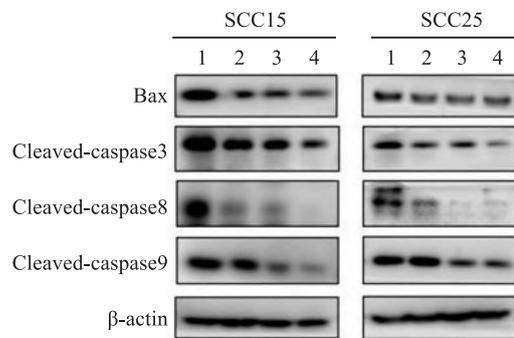


图9 A-GSP 对凋亡相关蛋白的表达影响

1: Control; 2: 500 µg/ml; 3: 1 000 µg/ml; 4: 1 500 µg/ml

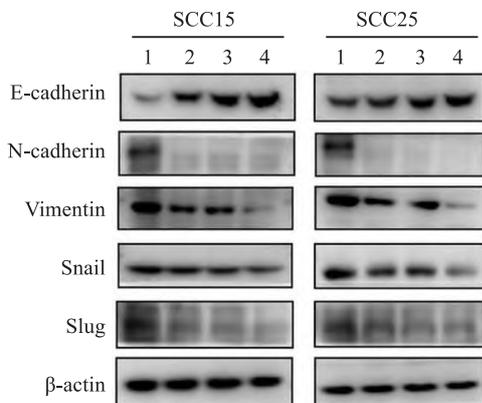


图8 A-GSP 对 EMT 相关蛋白的表达影响

1: Control; 2: 500 µg/ml; 3: 1 000 µg/ml; 4: 1 500 µg/ml

颈鳞癌细胞生物学行为的影响,发现 A-GSP 对 SCC15 和 SCC25 细胞展现出了可观的抗癌作用,并初步探讨其相关分子机制。

细胞周期调控的稳定性是细胞持续分裂的基础。CDKs 周期蛋白依赖性蛋白激酶,是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过对丝氨酸/苏氨酸蛋白的化学作用驱动细胞周期和周期蛋白 cyclin 协同作用,从而发挥着细胞周期调控的作用。CDK1 是其中一种对细胞周期进程至关重要的 CDK,因为它启

动有丝分裂的开始,并以高保真特性确保细胞复制中的关键事件以精确的顺序发生^[8]。本研究中,课题组发现 A-GSP 能显著降低 CDK1 表达。P21 以 P53 依赖方式失活 CDK,导致细胞分裂阻滞于 G1/S 期^[9]。细胞从 S 期顺利进入 G2 期,需要 Cyclin A-CDK1/2 两者相互辅助。G2/M 期顺利推进则离不开 cyclin B-CDK1 的推动作用^[8,9]。而 P21 可能成为任何一期的限速步骤。课题组研究发现 A-GSP 处理后,p21 的表达也明显升高,同样,细胞周期抑制蛋白 p27 呈现上调,提示 A-GSP 可能通过阻断 CDK1、p21、p27 的相关信号途径从而将细胞周期阻滞在 G2/M 期。转移是患者复发和病情走向终末期的罪魁祸首,EMT 被认为是肿瘤细胞启动迁徙特征性指标。在上皮细胞不断向间充质细胞演变过程中,代表两种类型细胞的分子呈现相应的表达变化^[10]。E-cadherin 是其中一种典型的上皮细胞标志物蛋白,E-cadherin 如果表达减少,会迅速削减上皮细胞与上皮细胞之间的黏附连接,从而使得肿瘤细胞获得运动能力,促进转移发生^[11]。课题组研究发现头颈鳞癌细胞系在 A-GSP 处理后,E-cadherin 表达随着药物浓度增大而升高,而间质细胞标志物 N-cadherin 和 Vimentin 则相应下调。Slug 和 Snail 是促进 EMT 的转录因子,它们能够调节上皮细胞骨架蛋白的表达情况,也能够调整细胞连接区域的结构部分^[10]。然而,A-GSP 也能使 Slug 和 Snail 表达明显下调,提示 A-GSP 限制肿瘤细胞 EMT。

此外,凋亡是一种自主有序的死亡形式。Cleaved-caspase 则是 Caspase 活化后形式。研究表明 Caspase-8 与 Caspase 家族的其他成员一样,作为单链失活性酶原(pro-Caspase-8)合成,是外源性凋亡通路的主要启动因子,但在一定条件下,也可以触发内源性通路外部途径^[12]。肿瘤坏死因子- α 在机体应对各种紧急变化和其它病理状态下分泌增多,绝大部分来源于巨噬细胞分泌产生。死亡受体也可促使细胞凋亡。研究表明当以上两者发生结合时,能导致 caspase-8 的激活,后者直接将引发下一步级联反应^[13]。与其他 caspases 家族成员相比,caspase-3 处于 caspase 级联的末端,在凋亡过程中同时受到内源性和外源性死亡途径的激活^[14]。课题组探究了 A-GSP 促进头颈鳞癌细胞凋亡是否依赖于 caspases 相关途径,然而,Cleaved-caspase3、Cleaved-caspase8、Cleaved-caspase9 的表达没有升高,促凋亡

蛋白 bax 并没有经灵芝孢子作用后而上调,这些结果提示 A-GSP 促进肿瘤细胞凋亡不主要依赖于经典 caspase 途径和 bax 途径,其具体的细胞死亡途径有待后续研究。

综上所述,本研究中 A-GSP 处理显著抑制头颈鳞癌细胞的增殖和迁移能力,这可能通过抑制肿瘤细胞的 EMT 来实现。A-GSP 处理促进了 P21 和 P27 的表达上调和 CDK1 表达下调,可能是导致细胞周期 G2/M 期阻滞的主要原因。这些研究结果初次揭示了 A-GSP 作为我国传统中药材灵芝的水溶液成分,在头颈鳞癌细胞中显示出优秀的抑癌作用,或可以为头颈鳞癌的治疗提供新的方向和可能。

参考文献

- [1] Day A T, Sher D J, Lee R C, et al. Head and neck oncology during the COVID-19 pandemic: Reconsidering traditional treatment paradigms in light of new surgical and other multilevel risks [J]. *Oral Oncol*,2020,105: 104684.
- [2] Sang T, Guo C, Guo D, et al. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation [J]. *Carbohydr Polym*, 2021,256: 117594.
- [3] Hu H, Ahn N S, Yang X, 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): 250-3.
- [4] Guo C, Guo D, Fang L, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon [J]. *Carbohydrate Polymers*,2021,267:119231.
- [5] Lin T Y, Hsu H Y, Sun W H, et al. Induction of Cbl-dependent epidermal growth factor receptor degradation in Ling Zhi-8 suppressed lung cancer [J]. *Int J Cancer*,2017,140(11): 2596-607.
- [6] Zhu L, Wu M, Li P, et al. High-pressure supercritical CO₂ extracts of *ganoderma iucidum* fruiting body and their anti-hepatoma effect associated with the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*,2020,11: 602702.
- [7] Jiao C, Chen W, Tan X, et al. *Ganoderma lucidum* spore oil induces apoptosis of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* by activating caspase-3 and caspase-9 [J]. *J Ethnopharmacol*,2020,247: 112256.
- [8] Mansilla S F, De La Vega M B, Calzetta N L, et al. CDK-independent and PCNA-dependent functions of p21 in DNA replication [J]. *Genes*,2020,11:593.
- [9] Wang L, Han H, Dong L, et al. Function of p21 and its therapeutic effects in esophageal cancer [J]. *Oncol Lett*,2021,21(2): 136.
- [10] Wang L, Yang G, Zhao D, et al. CD103-positive CSC exosome

- promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: role of remote MiR-19b-3p [J]. *Mol Cancer*,2019,18(1): 86.
- [11] Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT [J]. *Nature*,2018, 556(7702): 463–8.
- [12] Cui Z, Dabas H, Leonard B C, et al. Caspase-8 mutations associated with head and neck cancer differentially retain functional properties related to TRAIL-induced apoptosis and cytokine induction [J]. *Cell Death Dis*,2021,12:775.
- [13] Jiang M, Qi L, Li L, et al. Caspase-8: A key protein of cross-talk signal way in “PANoptosis” in cancer [J]. *Int J Cancer*,2021, 149(7): 1408–20.
- [14] Jiang M, Qi L, Li L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer [J]. *Cell Death Discov*,2020,6:112.

Aqueous-soluble components of sporoderm-removed *Ganoderma lucidum* spore powder inhibit the proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma

Wu Xiangping¹, Tai Yidi², Wang Yan², Zhang Bin¹

(¹*Dept of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*; ²*Key Laboratory of the Ministry of Education, Laboratory of Molecular Oncology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142*)

Abstract Objective To investigate the biological role of aqueous-soluble components of sporoderm-removed *Ganoderma lucidum* spore powder (A-GSP) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods** The effects of A-GSP on the proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma cells SCC15 and SCC25 were investigated using MTS, plate cloning, scratch healing experiments, and chamber penetration experiments. The effect of A-GSP on the apoptosis ability and cell cycle distribution of head and neck squamous cell carcinoma cells was detected using a flow cytometry assay kit. Western blot was used to detect the expression changes of epithelial mesenchymal transformation (EMT) molecules and cell cycle proteins after A-GSP treatment. **Results**

After the action of A-GSP, the proliferation ability of head and neck squamous cell carcinoma cells decreased ($F = 62.72$, $P < 0.0001$), the metastasis ability decreased ($F = 95.7$, $P < 0.001$), the apoptosis ability increased ($F = 87.65$, $P < 0.001$), and the G2/M phase stagnated ($F = 15.31$, $P < 0.01$). In addition, A-GSP treatment resulted in upregulation of epithelial cell markers E-cadherin, downregulation of mesenchymal cell markers Vimentin, N-cadherin, Snail, Slug, downregulation of cell cycle kinase CDK1, and upregulation of P21 and P27. However, it did not cause changes in the levels of apoptosis pathway proteins Caspase and Bax. **Conclusion** A-GSP inhibits the proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma cells by inducing G2/M phase arrest and inhibiting EMT.

Key words aqueous-soluble components of sporoderm-removed *Ganoderma lucidum* spore powder; head and neck squamous cell carcinoma; cell cycle; epithelial mesenchymal transformation