

网络出版时间: 2017-7-29 12:01 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.017.html>

◇ 药学研究 ◇

## 栎树桑黄提取物诱导胃癌细胞凋亡作用的研究

王菲菲 陈飞虎 李 宁 刘 峰 施 超 丁云云

**摘要** 目的 研究栎树桑黄乙醇提取物(OPL)对人胃癌细胞SGC-7901的抗肿瘤和诱导凋亡作用。方法 用不同浓度的OPL(0、40、80、160、240、320、400  $\mu\text{g/ml}$ )作用于4种不同人癌SGC-7901、HCT-116、MCF-7、Hela细胞48 h,MTT法检测药物抑制细胞增殖率;流式细胞术检测OPL对SGC-7901细胞周期的影响,Hoechst染色观察OPL对细胞核形态变化影响,Annexin-V/PI双染流式细胞仪检测OPL对细胞凋亡的影响,Western blot法检测SGC-7901周期蛋白CyclinD1的表达,凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、cleaved PARP蛋白的表达。结果 OPL明显呈现浓度依赖性地抑制SGC-7901细胞增殖,诱导细胞凋亡,将细胞周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期( $P < 0.05$ )。Western blot法显示OPL上调Bax、cleaved PARP蛋白表达,下调Bcl-2、CyclinD1蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论 OPL呈现浓度依赖性诱导胃癌SGC-7901细胞凋亡,并将细胞周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。

**关键词** 胃癌; 凋亡; 周期阻滞

**中图分类号** R 932; R 735.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)10-1495-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.017

胃癌是世界范围内第4位最常见的癌症,在癌症引起的死亡率中位列第2名<sup>[1]</sup>。而目前胃癌主要的治疗是外科手术切除,但是有很高的复发率,所以必须配合化学治疗,但目前的化疗药物存在严重的不良反应,减少白细胞,损伤肝肾功能,所以迫切需要一种低细胞毒性的抗肿瘤药物。栎树桑黄是一种主要生长在栎树树干上的高等真菌,其子实体在中国、韩国、日本等亚洲国家一直作为传统的药品和保健品用于各种疾病的治疗和预防。根据文献<sup>[2-3]</sup>报道桑黄具有抗炎抗氧化,保护肝脏和抗肿瘤作用,主

要含有苯酚、吡喃酮等活性成分<sup>[4]</sup>。该研究主要探索栎树桑黄乙醇提取物(oak *Phellinus linteus*, OPL)是否具有抗胃癌作用。

### 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂** 人癌细胞株SGC-7901、MCF-7、HCT-116、Hela购自南京凯基生物有限公司;DMEM高糖培养基购自美国Hyclone公司;MTT试剂购自美国Sigma公司;Annexin-V/PI凋亡试剂盒和细胞周期试剂盒均购自上海贝博生物有限公司;Hoechst试剂盒、PMSF(100 mmol/L)、蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液(强)购自上海碧云天生物技术有限公司;CyclinD1、Bcl-2、Bax和PARP抗体购自英国Abcam公司。OPL为本实验室用95%乙醇提取制备,提取率6.8%;OPL来源于栎树桑黄,为人工培养,规范化种植,质量可控。

**1.2 细胞培养** 4种不同肿瘤细胞在含有10%血清的高糖培养基中培养,并加入100 U/ml链霉素和100 U/ml青霉素,并放于5% CO<sub>2</sub>饱和湿度、37 °C恒温细胞培养箱中。

**1.3 MTT检测细胞增殖** 当SGC-7901、HCT-116、MCF-7、Hela细胞处于对数生长期时,以 $6 \times 10^4$ 个/ml的浓度接种于96孔培养板中,每孔接种量为100  $\mu\text{l}$ 。待细胞贴壁后,分为以下浓度药物组(0、40、80、160、320、400  $\mu\text{g/ml}$ ),药物作用48 h后,并加入MTT(浓度为5 mg/ml)20  $\mu\text{l}$  4 h后弃上清液,加入150  $\mu\text{l}$ 的DMSO,于摇床上放置15 min。于酶联免疫检测仪上测吸光度( $A_{490}$ )值。

**1.4 Annexin-V/PI双染法检测细胞凋亡** 当细胞处于对数生长期,将细胞调成浓度为 $1 \times 10^5$ /ml,再加入6孔板中,待细胞贴壁后弃去培养基,用0、80、160、240、320、400  $\mu\text{g/ml}$  OPL处理细胞48 h,每组设3个复孔。收集细胞,加入400  $\mu\text{l}$  Annexin-V结合液使细胞重悬,先后加入5  $\mu\text{l}$  FITC和10  $\mu\text{l}$  PI染色液分别避光孵育15 min和5 min,上机检测。

**1.5 Hoechst染色** SGC-7901接种于含有灭菌盖玻片的6孔板内,贴壁后用0、80、160、240、320  $\mu\text{g/ml}$

2017-05-26 接收

基金项目:安徽省科技厅科技重大专项(编号:16030801112)

作者单位:安徽医科大学药学院,安徽天然药物活性研究省级办公室,合肥 230032

作者简介:王菲菲,女,硕士研究生;

陈飞虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: cfhchina@sohu.com;

李 宁,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ln0110@sina.com

ml OPL 处理细胞 48 h 后小心取出盖玻片于载玻片上,加入固定液固定 20 min, PBS 清洗 3 遍,再加入 Hoechst 染色液于培养箱中染色 15 min,封片后荧光显微镜下观察。

**1.6 PI 染色流式细胞仪检测细胞周期** 将细胞接种于培养瓶中,待细胞铺满孔底约 50% 时,用 0、80、160、240、320  $\mu\text{g/ml}$  OPL 处理细胞 48 h,收集细胞,用预冷的 70% ~ 75% 冷乙醇固定 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,至少固定 18 h,之后加入 RnaseA 溶液 20  $\mu\text{l}$  37  $^{\circ}\text{C}$  水浴,最后加 400  $\mu\text{l}$  PI 染液避光 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。

**1.7 Western blot 法检测 Cyclin1、Bcl-2、Bax 和 PARP 蛋白表达** 经 0、120、240、360  $\mu\text{g/ml}$  OPL 作用于 SGC-7901 细胞 48 h 后,提取蛋白。采用 BCA 法蛋白定量 90  $^{\circ}\text{C}$  煮 10 min,放于 -80  $^{\circ}\text{C}$  长久保存。配制 10% 和 12% SDS-PAGE,加样电泳,转膜, PVDF 膜进行标记,封闭 2 h。一抗( $\beta$ -actin、Cyclin1、Bax、Bcl-2、PARP) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,二抗于室温孵育 2 h,结束后用 PBS 冲洗膜 3 次,最后显影。Image J 分析图片,计算结果。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用单因素方差分析组间计量资料,采用 *t* 检验进行两两比较,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 OPL 对 4 种不同人癌细胞生长的抑制作用** 使用 OPL(0、40、80、160、240、320、400  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用于 SGC-7901、HCT-116、MCF-7、Hela 细胞 48 h 后,MTT 检测结果,OPL 抑制细胞增殖,对细胞的增殖抑制率呈现浓度依赖性,在 400  $\mu\text{g/ml}$  达到最大抑制率( $F = 149.553、12.198、104.321、42.508, P < 0.05$ ),见图 1。

**2.2 OPL 对细胞凋亡的影响** 细胞用不同浓度的 OPL 培养 48 h 后,OPL 以浓度依赖性诱导 SGC-7901 细胞凋亡,用 0、80、160、240、320、400  $\mu\text{g/ml}$  的 OPL 处理 SGC-7901 细胞后,凋亡率分别为(4.47  $\pm$  0.33)%、(7.01  $\pm$  0.91)%、(17.21  $\pm$  1.59)%、(17.25  $\pm$  1.73)%、(33.70  $\pm$  3.36)%、(51.83  $\pm$  4.82)%。流式结果显示,与细胞对照组相比,当 OPL 的剂量达到 160  $\mu\text{g/ml}$  时,其对 SGC-7901 细胞的凋亡差异有统计学意义( $F = 132.712, P < 0.01$ ),见图 2。

**2.3 OPL 对细胞核形态的影响** OPL 作用于 SGC-7901 细胞 48 h 后,Hoechst 染色观察,细胞对照

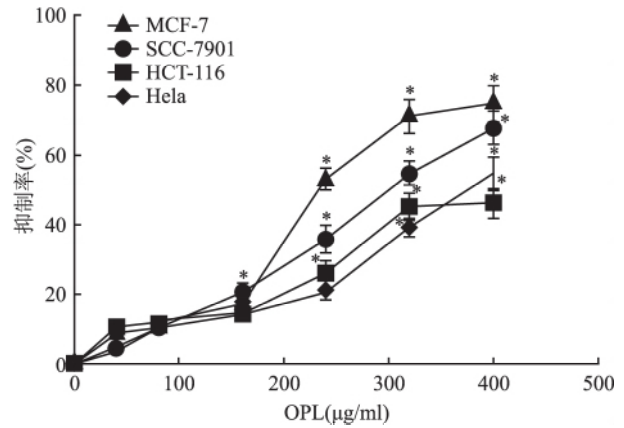


图 1 MTT 法检测 OPL 对 SGC-7901、HCT-116、MCF-7、Hela 细胞的影响  
与 0  $\mu\text{g/ml}$  OPL 比较: \*  $P < 0.05$

组细胞核核膜完整,细胞核为均一卵圆形,染色均匀,呈现出均匀的蓝色荧光;药物组细胞核收缩、致密浓染、形态不规则、核染色质固缩,部分碎裂成凋亡小体,折光性变强,随着药物浓度的增加,细胞核局部会呈现出更强烈的蓝色荧光,见图 3。

**2.4 OPL 对细胞周期的影响** 胃癌 SGC-7901 细胞在不同浓度的 OPL(0、80、160、240、320  $\mu\text{g/ml}$ ) 培养 48 h 后,和正常细胞组比较,OPL 导致 G0/G1 期细胞显著增加,并呈浓度依赖性,当用 320  $\mu\text{g/ml}$  OPL 作用于胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后,G0/G1 细胞比例提高到 68.88%,见图 4。

**2.5 OPL 对周期和凋亡相关蛋白的影响** 用不同浓度的 OPL(0、120、240、360  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用于胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后,Western blot 结果显示 OPL 可以下调周期相关蛋白 Cyclin1 的表达( $F = 83.405, P < 0.01$ ),下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达( $F = 26.284, P < 0.01$ ),上调促凋亡蛋白 Bax 和 PARP 剪切体的表达( $F = 17.298、264.986, P < 0.01$ ),见图 5。

## 3 讨论

目前的化疗药物存在严重的不良反应,减少白细胞,损伤肝肾功能,所以迫切需要一种低细胞毒性的抗肿瘤药物。于是寻找低毒有效的治疗癌症的药物一直是研究热点。而栎树桑黄是一种真菌,在东方很多国家一直作为药品和食品使用。栎树桑黄含有很多活性化合物,可以预防和治疗各种疾病,如胃肠道疾病和癌症。关于桑黄对肿瘤细胞的细胞毒作用一直在研究<sup>[5-6]</sup>。根据以往文献<sup>[7]</sup>报道,桑黄多糖可以在体内外抑制胃癌细胞,体外呈现浓度依赖

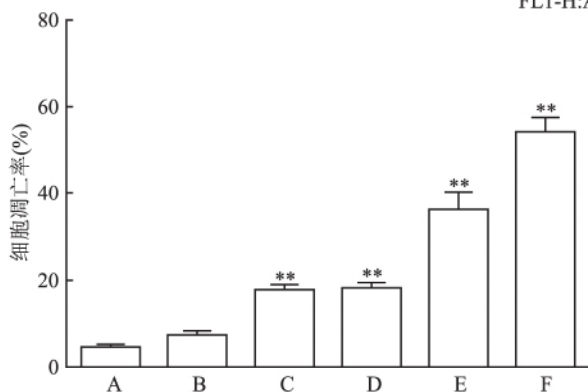
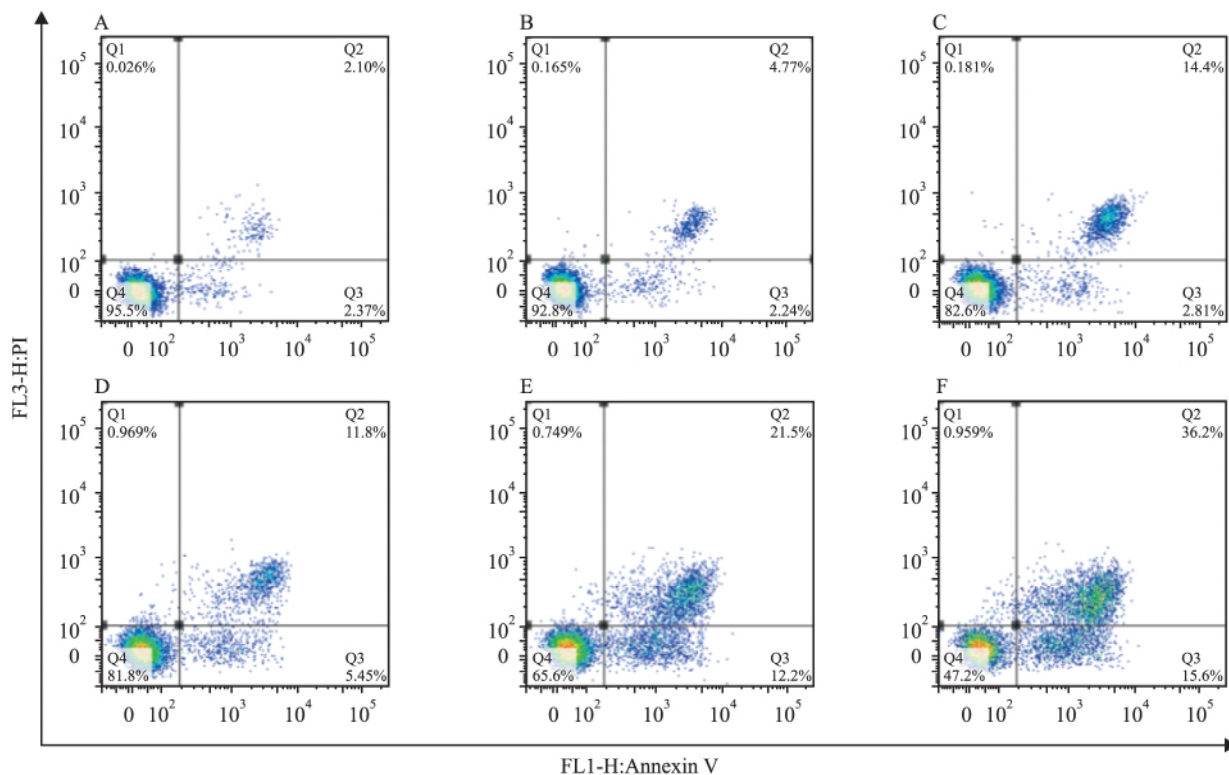


图2 OPL 诱导 SGC-7901 细胞凋亡  
A: 细胞对照组; B: 80  $\mu\text{g/ml}$  OPL; C: 160  $\mu\text{g/ml}$  OPL; D: 240  $\mu\text{g/ml}$  OPL; E: 320  $\mu\text{g/ml}$  OPL; F: 400  $\mu\text{g/ml}$  OPL; 与细胞对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

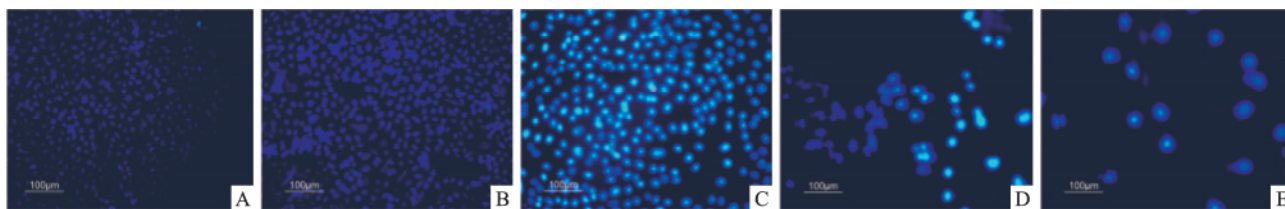


图3 OPL 对胃癌 SGC-7901 细胞核形态的影响 Hoechst 染色  $\times 200$   
A: 细胞对照组; B: 80  $\mu\text{g/ml}$  OPL; C: 160  $\mu\text{g/ml}$  OPL; D: 240  $\mu\text{g/ml}$  OPL; E: 320  $\mu\text{g/ml}$  OPL

性地抑制细胞增殖和增加细胞凋亡,表明桑黄多糖可以明显抑制人类胃癌肿瘤生长,且没有明显的不良反应。OPL 可以抑制呈现浓度依赖性抑制肿瘤细胞增殖<sup>[8-9]</sup>。从 OPL 里可以分离出活性成分 Hispolon 可以呈现浓度依赖性地抑制表皮 KB 细胞的增殖,并且可以引起细胞周期 G1 期阻滞<sup>[10-11]</sup>。

细胞失控性过度增殖是恶性肿瘤的一个显著特征,首先本研究用 MTT 比色法检测 OPL 对 4 种人肿

瘤细胞增殖抑制试验,结果显示,OPL 可以呈现浓度依赖性的抑制肿瘤细胞增殖。凋亡是一种程序性死亡方式,在凋亡的过程中,细胞变圆、细胞核片段化、凋亡小体形成,并伴有线粒体膜电位的下降。为了探索 OPL 是否通过诱导凋亡来发挥抗肿瘤作用,本研究用 Annexin-V-FITC/PI 双染和 Hoechst 染色检测 OPL 对细胞作用,结果显示,OPL 可以诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡。为了探索 OPL 对胃癌 SGC-

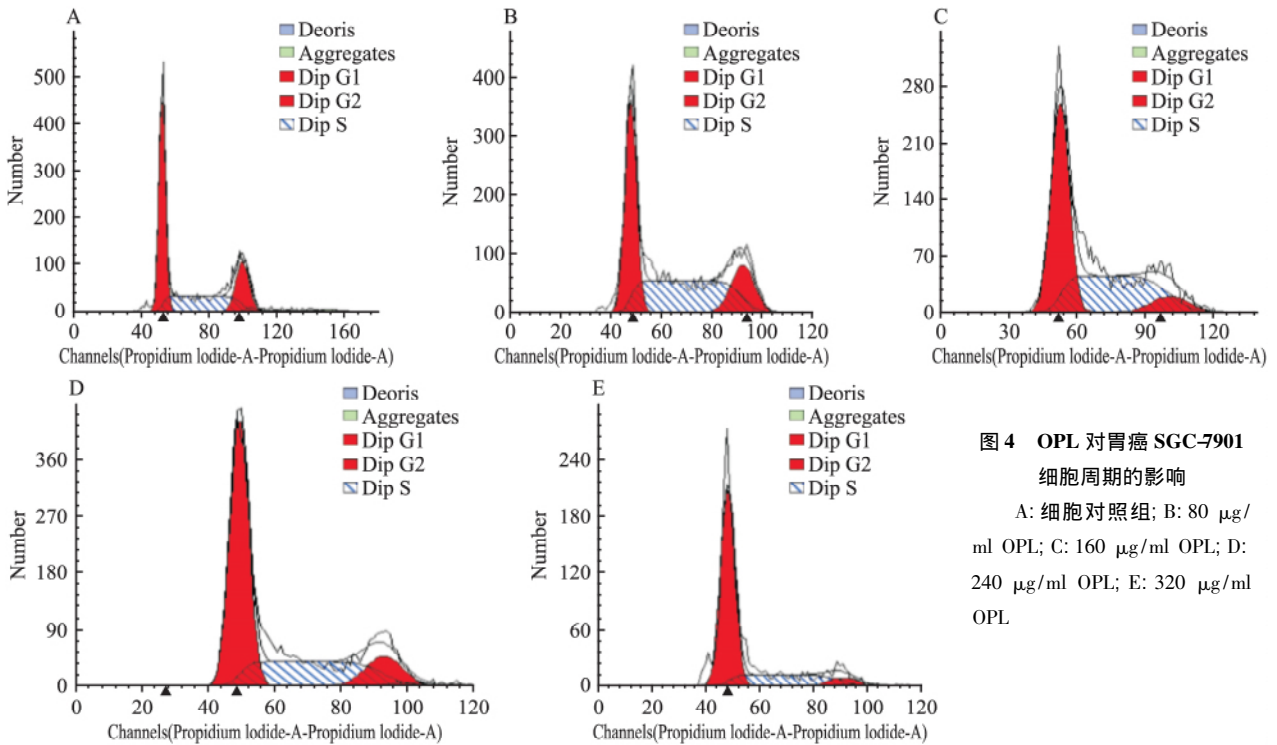


图4 OPL对胃癌SGC-7901细胞周期的影响  
A: 细胞对照组; B: 80 µg/ml OPL; C: 160 µg/ml OPL; D: 240 µg/ml OPL; E: 320 µg/ml OPL

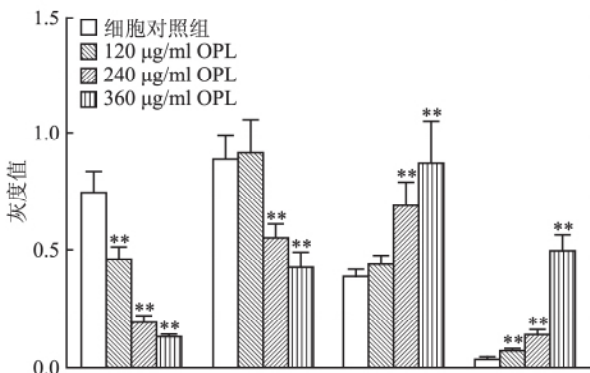
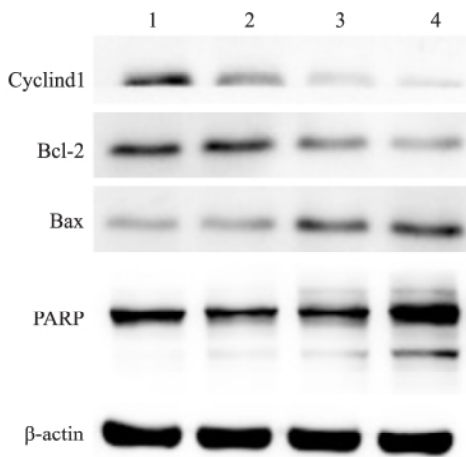


图5 Western blot法检测OPL对CyclinD1、Bcl-2、Bax和PARP蛋白表达的影响

1: 细胞对照组; 2: 120 µg/ml OPL; 3: 240 µg/ml OPL; 4: 360 µg/ml OPL; A: CyclinD1/β-actin; B: Bcl-2/β-actin; C: Bax/β-actin; D: cleaved PARP/β-actin; 与细胞对照组比较: \*\* P < 0.01

7901 细胞周期的影响,用 320 µg/ml OPL 作用于胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞比例提高到 68.88%。而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞的显著性增加是凋亡的感性指标<sup>[10]</sup>。癌症的特点就是不受控制的细胞增殖<sup>[12-14]</sup>。凋亡主要通过 3 种途径引起细胞死亡的,内质网应激途径(伴随标志性蛋白 CHOP 表达)、线粒体途径,还有细胞外死亡受体介导的途径。而线粒体途径介导的凋亡常与 Bcl-2 蛋白家族(包括对凋亡起正性调节的促凋亡亚族 Bax 亚族和对凋亡起负性调节的抗凋亡亚族 Bcl-2 亚族)有关<sup>[15]</sup>。Bax 是一种促凋亡蛋白,以无活性的单体形式存在于细胞质中,在应激因子或凋亡因子的作用下,促凋亡蛋白 Bax 在线粒体膜上聚集并构象发生寡聚化,构成线粒体外膜的孔,引起线粒体膜电位的下降、线粒体膜通透性发生改变、细胞色素 C 释放,一旦细胞色素 C 释放到细胞质中,就会引起半胱氨酸酶 9 的激活,从而引起下游的凋亡执行者,半胱氨酸酶 3 的激活,半胱氨酸酶 3 激活后,越来越多的细胞介质,包括 DNA 修复蛋白 PARP,都会被降解或者剪切,从而导致细胞死亡。而抗凋亡蛋白 Bcl-2 存在于线粒体膜外,可以移位到线粒体内封闭 Bax 所形成的孔道和阻止细胞色素 C 的释放,从而抑制凋亡的发生。与细胞对照组相比, OPL 可明显降低抗凋亡蛋白 Bcl-2,增加细胞内促凋亡 Bax 蛋白表达,增加 PARP 片段化。

本研究结果显示,OPL可以抑制胃癌SGC-7901细胞增殖,诱导凋亡,并引起细胞周期阻滞。对于OPL所引起的细胞凋亡具体机制尚需后续实验继续探索。

### 参考文献

- [1] Torre L A , Bray F , Siegel R L , et al. Global cancer statistics , 2012[J]. *CA Cancer J Clin* ,2015 ,65(2) : 87 - 108.
- [2] Im K H , Nguyen T K , Kim J K , et al. Evaluation of anticholinesterase and inflammation inhibitory activity of medicinal mushroom *Phellinus pini* (*Basidiomycetes*) fruiting bodies [J]. *Int J Med Mushrooms* ,2016 ,18(11) : 1011 - 22.
- [3] Dong Y , He Y , Yu Z , et al. Metabolomic investigation of rat serum following oral administration of the willow bracket medicinal mushroom , *Phellinus igniarius*(*Agaricomycetes*) , by UPLC-HDMS [J]. *Int J Med Mushrooms* ,2016 ,18(8) : 699 - 711.
- [4] Li S C , Yang X M , Ma H L , et al. Purification , characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia [J]. *Carbohydr Polym* ,2015 ,133: 24 - 30.
- [5] Mei Y , Zhu H , Hu Q , et al. A novel polysaccharide from mycelia of cultured *Phellinus linteus* displays antitumor activity through apoptosis [J]. *Carbohydr Polym* ,2015 ,124: 90 - 7.
- [6] Wu Q , Kang Y , Zhang H , et al. The anticancer effects of hispolon on lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2014 ,453(3) : 385 - 91.
- [7] Li Y G , Ji D F , Zhong S , et al. Polysaccharide from *Phellinus linteus* induces S-phase arrest in HepG2 cells by decreasing calreticulin expression and activating the P27kip1-cyclin A/D1/E-CDK2 pathway [J]. *J Ethnopharmacol* 2013 ,150(1) : 187 - 95.
- [8] Kim J H , Kim Y C , Park B. Hispolon from *Phellinus linteus* induces apoptosis and sensitizes human cancer cells to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through upregulation of death receptors [J]. *Oncol Rep* ,2016 ,35(2) : 1020 - 6.
- [9] Lee W Y , Hsu K F , Chiang T A , et al. *Phellinus linteus* extract induces autophagy and synergizes with 5-fluorouracil to inhibit breast cancer cell growth [J]. *Nutr Cancer* ,2015 ,67(2) : 275 - 84.
- [10] Chen Y C , Chang H Y , Deng J S , et al. Hispolon from *Phellinus linteus* induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in NB4 human leukaemia cells [J]. *Am J Chin Med* ,2013 ,41(6) : 1439 - 57.
- [11] Bae I Y , Shin J Y , Lee H G. Preparation of Black Hoof medicinal mushroom *Phellinus linteus*( Berk et MA Curt) Teng( Aphyllophoromycetidae) beta-glucan sulfate and *in vitro* tumor cell growth inhibitory activity [J]. *Int J Med Mushrooms* ,2011 ,13(2) : 115 - 20.
- [12] Song K S , Li G , Kim J S , et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth , invasion , and angiogenesis and alters Wnt/ $\beta$ -catenin in SW480 human colon cancer cells [J]. *BMC Cancer* ,2011 ,11: 307.
- [13] Liu M M , Zeng P , Li X T , et al. Antitumor and immunomodulation activities of polysaccharide from *Phellinus baumii* [J]. *Int J Biol Macromol* ,2016 ,91: 1199 - 205.
- [14] Zhong S , Ji D F , Li Y G , et al. Activation of P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 pathway by polysaccharide from *Phellinus linteus* leads to S-phase arrest in HT-29 cells [J]. *Chem Biol Interact* ,2013 ,206(2) : 222 - 9.
- [15] Pei J J , Wang Z B , Ma H L , et al. Structural features and antitumor activity of a novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia [J]. *Carbohydr Polym* 2015 ,115: 472 - 7.

## Study on the apoptosis of gastric cancer cells induced by extractions from oak *Phellinus linteus*

Wang Feifei , Chen Feihu , Li Ning , et al

(*School of Pharmacy , Anhui Medical University , Anhui Provincial Laboratory on Bioactivity of Natural Products , Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the antitumor and apoptosis induction effect of extractions from oak *Phellinus linteus* (OPL) against human gastric SGC-7901 cancer. **Methods** Human SGC-7901 , HCT-116 , MCF-7 , HeLa cancer cells were cultured with OPL(0 40 80 160 240 320 400  $\mu$ g/ml) for 48 h. The proliferation was evaluated via MTT assays , the cell cycle was analyzed through flow cytometry , Hoechst staining was used to observe OPL impact on nuclear shape change , and the apoptosis state was analyzed by Annexin-V/PI staining assays. The expression of apoptosis-related and cycle-related proteins was determined by Western blot. **Results** OPL could significantly reduce cell viability , induce apoptosis , and arrest SGC-7901 cell cycle at the G0/G1 phases ( $P < 0.05$ ) . Western blot method further confirmed that OPL could increased bax and the subsequent cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase , decreased CyclinD1 and Bcl-2 protein expression ( $P < 0.05$ ) . **Conclusion** Our findings suggest that OPL can induce apoptosis in human gastric SGC-7901 cancer cells , and cause cell cycle arrest in G0/G1 phase.

**Key words** gastric cancer; apoptosis; cell cycle arrest