

香菇多糖对神经胶质瘤 SHG-44 细胞增殖、周期、凋亡及迁移的影响

万茜淋^{1,2}, 任雨贺³, 吕瑞娜², 李 玉², 陈长宝^{1*}, 刘淑莹^{1,4*}

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 2. 吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118; 3. 中国农业科学院特产研究院, 吉林 长春 130112; 4. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

摘要: 目的 探究香菇多糖对神经胶质瘤 SHG-44 细胞增殖、周期、凋亡及迁移的影响。方法 CCK-8 法分析香菇多糖对 SHG-44 细胞增殖的影响, 采用流式细胞术检测香菇多糖对 SHG-44 细胞的周期变化, DAPI 染色法结合显微镜分析观察药物对细胞凋亡形态的影响, Annexin V-FITC/PI 双染法检测作用后 SHG-44 细胞的凋亡情况, 采用细胞划伤愈合实验初步判定香菇多糖对 SHG-44 细胞迁移能力的影响。**结果** 香菇多糖可以明显抑制 SHG-44 细胞增殖, 作用 48 h 效果最好, IC₅₀ 值为 2.295 mg/mL。与 0 mg/mL 香菇多糖组比较, 2.295 mg/mL 香菇多糖能够显著抑制 SHG-44 细胞迁移 ($P < 0.01$), 并可能诱导 SHG-44 细胞凋亡; 并且 4 mg/mL 香菇多糖将 SHG-44 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 香菇多糖对人神经胶质瘤 SHG-44 细胞具有显著的增殖抑制作用, 作用机制是通过调控 SHG-44 细胞周期, 从而抑制细胞增殖, 同时抑制肿瘤细胞迁移。

关键词: 香菇多糖; 神经胶质瘤; 抗肿瘤活性; 细胞凋亡; 细胞周期; 细胞迁移

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)11-2614-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.012

Effects of lentinan on proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of glioma SHG-44 cells

WAN Xi-lin^{1,2}, REN Yu-he³, LÜ Rui-na², LI Yu², CHEN Chang-bao^{1*}, LIU Shu-ying^{1,4*}

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Institute of Special Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China; 4. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of lentinan (LNT) on proliferation, cell cycle, apoptosis and migration of glioma SHG-44 cells. **METHODS** The effects of LNT on SHG-44 cells proliferation was analyzed by CCK-8, on cell cycle by flow cytometry, on apoptotic morphology by combinative use of DAPI staining and microscopy, and on cell apoptosis by Annexin V-FITC/PI double staining, respectively. Subsequently, impact on the cellular migration ability due to LNT was preliminarily determined by using the cell scratch healing experiment. **RESULTS** LNT significantly inhibited the activity of SHG-44 cells, gaining the most satisfying effect at 48h, and 2.295 mg/mL IC₅₀ value. Compared with the group dosed with 0 mg/mL LNT, the group intervened with 2.295 mg/mL LNT shared significantly inhibited migration of SHG-44 cells ($P < 0.01$), and inducted apoptosis of SHG-44 cells. Moreover, LNT group (4 mg/mL) displayed blocked cell cycle of SHG-44 at G₀/G₁ phase ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** LNT has a significant inhibitory effect on the proliferation of human glioma

收稿日期: 2019-03-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21475012); 吉林省中药管理局科技项目 (2018026); 吉林省人参科学研究院种子基金 (2019); 吉林省自然科学基金主题引导项目 (20190201297JC)

作者简介: 万茜淋 (1987—), 硕士, 实验师, 研究方向为中药活性物质筛选与表征。Tel: 18088667792, E-mail: wanxilin1987@163.com

* 通信作者: 陈长宝 (1967—), 博士, 研究员, 研究方向为中药化学。E-mail: ccb2021@126.com

刘淑莹 (1943—), 博士, 教授, 研究员, 研究方向为中药化学。E-mail: syliu@ciac.ac.cn

SHG-44 cells, and the underlying mechanism may be the regulation of cell cycle of SHG-44 cells, thus inhibition of both the proliferation and the migration of tumor cells.

KEY WORDS: lentinan (LNT); glioma; antitumor activity; cell apoptosis; cell cycle; cell migration

香菇 *Lentinus edodes* 是香菇属的一个种, 隶属于真菌界, 担子菌门, 蘑菇纲, 多孔菌目, 多孔菌科。香菇素有山珍之王之称, 亦是著名的药食同源菌种, 味甘、性平, 在我国传统医学中用于治疗食欲减退、少气乏力等症^[1]。香菇多糖 (Lentinan, LNT) 是从香菇中提取分离得到的结构以 β - (1→3) -D-葡聚糖残基为主链的成分, 也是香菇的主要活性成分。早在 1969 年, 日本学者 Chihara 等就研究发现香菇多糖的抗肿瘤活性, 从研究到临床应用已近 50 年时间, 香菇多糖一直是香菇中被学者们重点关注的活性成分^[2]。

2017 年 2 月, 国家癌症中心发布了中国最新癌症数据, 全国每天约 1 万人确诊癌症, 每分钟约 7 人确诊患癌。神经胶质瘤, 简称胶质瘤, 也称为胶质细胞瘤, 是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 是一种遗传易感性和环境致癌因素极高的脑部恶性肿瘤, 约占所有颅内原发肿瘤的一半^[3]。目前, 胶质瘤的首选治疗手段为手术切除, 但是由于其与正常脑组织无明显界限, 难以达到细胞学上的彻底切除, 术后复发快、复发率高、生存期短^[4]。因此, 针对神经胶质瘤的发生和发展, 从根本上进行新型抗肿瘤药物的研发刻不容缓。

已有研究发现, 香菇多糖具有抗肿瘤^[5]、抗氧化^[6]、抗抑郁^[7]、抗衰老^[8]、抗病毒^[9]、抗辐射^[10]以及免疫功能调节^[11]等多种生物活性, 并已经作为免疫增强剂部分应用于临床治疗, 可见香菇多糖在学术及临床水平上, 受到各国广泛的关注和认可。本实验以人神经胶质瘤 SHG-44 细胞为研究对象, 考察香菇多糖对细胞增殖、周期、凋亡以及迁移的影响, 为进一步研究香菇多糖抗肿瘤的作用机制及作用靶点提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人神经胶质瘤 SHG-44 细胞系, 购于中国科学院上海细胞生物学研究所, 由本实验室传代冻存。

1.2 试剂 香菇多糖, 购于上海源叶生物科技有限公司, 批号 C17S9Y69375, 含有量 >98%, 褐色粉末。DMEM 高糖培养基 (美国 Sigma 公司, 批号 11965-084); 超级新生牛血清 (NBS) (杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 22011-8615); 胰

蛋白酶 (上海生工生物工程有限公司, 批号 A100260-0010); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司, 批号 KGA108-1); DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C1005); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C1052); Cell Counting Kit-8 试剂盒 (CCK-8 Kit) (Med Chem Express USA, 批号 HY-K0301); 青链霉素双抗 (上海生工生物工程有限公司, 批号 E607011-0100)。

1.3 仪器 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon Ri2 公司); 酶标仪 (瑞士 TECAN); 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo BB150); 四度医用冷藏箱 (海尔 SC-242D); 双人单面超净工作台 (苏净安泰空气技术有限公司 SW-CJ-1C); 全自动立式高压灭菌锅 (致微 GR60DA); 台式离心机 (美国 ThermoST8R); 电热恒温水浴锅 (精宏 DK-S26); -20 度冷冻冰柜 (扬子 BD/BC-148); 加热鼓风干燥箱 (精宏 DHG-9240A); 流式细胞仪 (美国 BD Canto II)。

2 方法

2.1 神经胶质瘤细胞系 SHG-44 传代培养 人神经胶质瘤细胞系 SHG-44, 培养于含 10% NBS 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C 恒温培养箱内, 5% CO₂ 培养, 待细胞密度达到 90% 时, 继续传代。

2.2 细胞增殖检测实验 采用 CCK-8 法检测香菇多糖对 SHG-44 细胞增殖的影响^[12]。取对数生长期的 SHG-44 细胞, 每孔接种 6 000 个细胞于 96 孔板, 培养 24 h。弃旧培养基, 每孔加入 100 μ L 含药培养基, 使药物浓度分别为 0、0.25、0.50、1、2、4 mg/mL^[13-14], 同一质量浓度设 5 个复孔。继续分别培养 24、48、72 h, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液继续培养 2 h, 酶标仪测定吸光值 A (450 nm 波长)。根据以下公式计算, 活性抑制率 = $[(A_{0\text{加药组}} - A_{\text{加药组}}) / (A_{0\text{加药组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$, $\lg IC_{50} = \lg \text{最大剂量} - \lg (\text{最大剂量} / \text{相临剂量})$ [阳性反应率之和 - (3 - 最大阳性反应率 - 最小阳性反应率) / 4]。

2.3 细胞周期检测实验 选用细胞周期检测试剂盒检测 SHG-44 细胞周期。取对数生长期的细胞,

每孔 4×10^5 个接种于6孔板,培养24 h。弃去旧培养基,每孔加入2 mL含香菇多糖的新鲜培养基,使药物浓度分别为0、2、4 mg/mL,继续培养48 h,收集细胞,按照试剂盒操作步骤进行实验。

2.4 显微镜观察细胞形态 取对数生长期的SHG-44细胞,铺板及培养条件同2.3项下。香菇多糖加药浓度分别为0.00、2.295 mg/mL,继续培养48 h,显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.5 细胞凋亡检测实验 利用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒检测 SHG-44 细胞凋亡。取对数生长期的 SHG-44 细胞,铺板及培养条件同 2.3 项下,按照试剂盒操作步骤进行实验,用流式细胞仪检测分析。

2.6 细胞迁移检测实验 采用细胞划伤愈合实验^[15]检测细胞迁移。取对数生长期的 SHG-44 细胞,接种于6孔板中,待细胞密度增殖至80%,用

移液器吸头将细胞以井字划伤, PBS 洗涤, 加药浓度分别为0、2.295 mg/mL, 继续培养48 h, 置于显微镜下观察并拍照。

2.7 统计学分析 统计学分析取3次重复实验结果,上述实验所得数据均使用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 7.0 数据处理系统进行统计,数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析、*t* 检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 香菇多糖对 SHG-44 细胞增殖的影响 由表1可见,香菇多糖对神经胶质瘤细胞 SHG-44 的增殖抑制作用呈浓度依赖性增加。香菇多糖处理 SHG-44 细胞 48 h, 抑制率 IC_{50} 值为 2.295 mg/mL, 处理 72 h 抑制率 IC_{50} 值为 2.804 mg/mL。由于 24 h 的最大抑制率未达到 50%, 因此 IC_{50} 值仅作为参考, 故选用 48 h 的 IC_{50} 值 2.295 mg/mL 进行后续实验。

表 1 香菇多糖对 SHG-44 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Effects of LNT on cellular proliferation of SHG-44 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 24 h | | 48 h | | 72 h | |
|------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | 吸光度 | 抑制率/% | 吸光度 | 抑制率/% | 吸光度 | 抑制率/% |
| 空白组 | 0.13±0.00 | - | 0.20±0.01 | - | 0.19±0.00 | - |
| 0 mg/mL 香菇多糖组 | 1.14±0.02 | 0 | 1.83±0.06 | 0 | 1.71±0.04 | 0 |
| 0.25 mg/mL 香菇多糖组 | 2.08±0.04 | 4.29±1.73** | 1.40±0.03 | 7.20±1.29** | 1.53±0.10 | 3.80±0.87 |
| 0.5 mg/mL 香菇多糖组 | 3.58±0.02 | 8.11±1.31** | 1.71±0.08 | 26.15±2.16** | 1.66±0.09 | 12.13±3.02** |
| 1 mg/mL 香菇多糖组 | 4.44±0.07 | 17.49±1.27** | 1.29±0.05 | 32.90±2.34** | 1.40±0.03 | 20.55±2.43** |
| 2 mg/mL 香菇多糖组 | 6.28±0.04 | 27.07±1.66** | 1.04±0.08 | 48.79±3.02** | 1.11±0.09 | 39.47±2.72** |
| 4 mg/mL 香菇多糖组 | 8.93±0.04 | 41.04±0.62** | 0.87±0.04 | 59.03±1.14** | 0.79±0.07 | 61.07±3.91** |

注:与0 mg/mL 香菇多糖组比较,** $P < 0.01$

3.2 香菇多糖对 SHG-44 细胞周期的影响 如表2所示,香菇多糖作用 SHG-44 细胞 48 h 后,与0 mg/mL 香菇多糖组比较,4 mg/mL 香菇多糖组细胞 G1 期比例显著升高 ($P < 0.05$); 2、4 mg/mL 香菇多糖组细胞 S 期比例显著减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 G2 期无明显变化。香菇多糖能够抑制细胞从 G1 期向 S 期转变, 将细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 从而抑制 SHG-44 细胞的增殖。

表 2 香菇多糖对 SHG-44 细胞周期的影响 (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 2 Effects of LNT on cell cycle of SHG-44 (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | G1 期 | S 期 | G2 期 |
|---------------|-------------|--------------|-----------|
| 0 mg/mL 香菇多糖组 | 67.21±1.46 | 27.00±4.28 | 6.15±4.96 |
| 2 mg/mL 香菇多糖组 | 75.62±7.82 | 16.20±5.40* | 6.18±4.98 |
| 4 mg/mL 香菇多糖组 | 82.38±7.11* | 11.78±3.25** | 5.84±3.91 |

注:与0 mg/mL 香菇多糖组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 香菇多糖对 SHG-44 细胞形态学的影响 如图1所示,香菇多糖处理48 h后,显微镜常光观察,0 mg/mL 香菇多糖组细胞生长状态良好,形态

完整,细胞数量相对较多,大小均一,细胞密集且铺展生长,连接紧密;2.295 mg/mL 香菇多糖组细胞数量显著减少,密度降低,且悬浮细胞逐渐增多,细胞形态皱缩,呈圆珠状,细胞核凸显,形态发生变异。

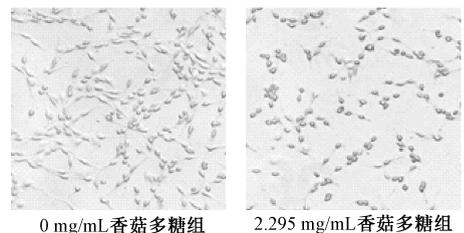


图 1 香菇多糖对 SHG-44 细胞形态学的影响

Fig. 1 Effects of LNT on morphology of SHG-44 cells

3.4 香菇多糖对 SHG-44 细胞凋亡的影响 图2为流式细胞仪检测的凋亡散点图, Q1、Q2、Q3、Q4 4 个象限分别代表死细胞、晚期凋亡细胞、活细胞、早期凋亡细胞。如表3所示,可进一步看出香菇多糖作用 SHG-44 细胞 48 h 后,细胞的晚期凋

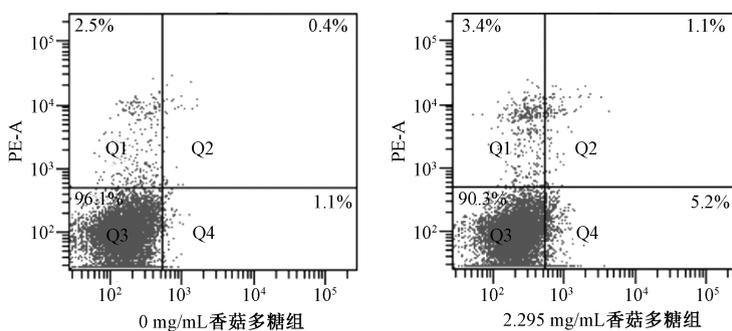


图2 香菇多糖对 SHG-44 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effects of LNT on apoptosis of SHG-44 cells

亡及总凋亡比例有升高, 但统计结果并未出现显著性差异。

表3 香菇多糖对 SHG-44 细胞凋亡的影响 (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 3 Effects of LNT on apoptosis of SHG-44 cells (% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 早凋亡 | 晚凋亡 | 总凋亡 |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0 mg/mL 香菇多糖组 | 2.13±1.17 | 0.57±0.15 | 2.70±1.31 |
| 2.295 mg/mL 香菇多糖组 | 3.60±1.47 | 0.93±0.29 | 4.53±1.70 |

3.5 香菇多糖对 SHG-44 细胞迁移能力的影响

如表4、图3所示, 当 SHG-44 细胞处理 48 h 后, 0 mg/mL 香菇多糖组细胞向划伤处迁移生长, 2.295 mg/mL 香菇多糖组细胞向内生长较少, 并且划伤处宽度略有增加; 与 0 mg/mL 香菇多糖组比较, 2.295 mg/mL 香菇多糖组细胞划伤处面积显著缩小 ($P < 0.01$)。

表4 香菇多糖对 SHG-44 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 4 Effects of LNT on migration ability of SHG-44 Cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 时间/h | 面积/ μm^2 | 增长率/% |
|-------------------|------|------------------------|---------------|
| 0 mg/mL 香菇多糖组 | 0 | 428 166.10±32 145.13 | 27.95±7.55 |
| | 48 | 306 960.47±13 333.91 | |
| 2.295 mg/mL 香菇多糖组 | 0 | 509 440.60±69 839.92 | |
| | 48 | 563 209.02±41 734.15** | -10.55±7.78** |

注: 与 0 mg/mL 香菇多糖组比较, ** $P < 0.01$

4 讨论

香菇, 作为与人类生活密切相关的大型真菌, 是应用最为广泛的食药菌资源。中国是人工栽培香菇的发源地和世界香菇第一生产大国, 目前, 我国香菇年产量约为 10 万吨, 占世界总产量的 90% 以上^[16]。近年来, 随着中药受到越来越多的关注, 医学界逐渐采用中药辅助治疗多种疾病, 中药制剂也作为放疗之后改善机体免疫力、降低药物不良反应的功能性药物^[17-20]。对于香菇多糖的药理活性研究, 世界各国均在不同程度的开展。有研究发现, 香菇多糖对小鼠肝癌细胞 H22、小鼠肛门纤维

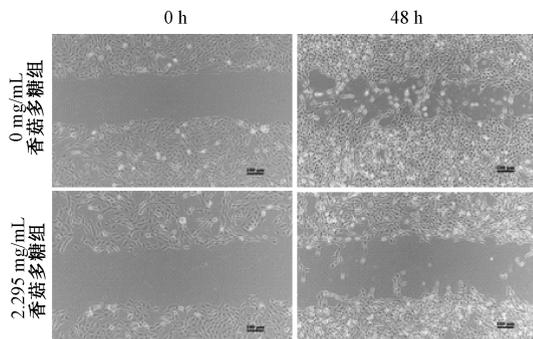


图3 香菇多糖对 SHG-44 细胞迁移能力的影响

Fig. 3 Effects of LNT on migration ability of SHG-44 cells

肉瘤细胞 S180、人肝癌细胞 HepG2、人口腔上皮癌细胞株 KB-3-1、人宫颈癌细胞株 HeLa 等都有不同程度的抑制作用, 并且可作为辅助剂与抗癌药物联用, 发挥肿瘤抑制作用^[21-23]。同时, 在肿瘤免疫学方向, 香菇多糖能够选择性地抑制黑色素瘤的炎症激活^[24]。结合香菇多糖在提高免疫功能的作用机制研究, 很可能是通过激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和 NF- κ B 2 个信号途径调节免疫功能^[25]。综合近几年研究成果, 真菌提取物能够抑制多种肿瘤细胞的增殖, 并诱导其凋亡, 其机制与 Wnt、NK- κ B、MAPK、线粒体凋亡等多种信号通路相关, 靶点包括了 p38、Bcl-2、c-jun、I κ B、 β -catenin、Akt、ROS 等多种与细胞生物活动密切相关的蛋白^[26-27]。

本研究采用 CCK-8 法检测香菇多糖对人类神经胶质瘤 SHG-44 细胞增殖能力的作用。CCK-8 方法原理与 MTT 相同, 但操作方便, 不用中途吸取细胞上层液体, 避免细胞流失造成的细胞增殖数量误差, 所得数据更加精确可靠。实验结果表明, 香菇多糖能够显著抑制神经胶质瘤 SHG-44 细胞的增殖活性, 并且呈剂量依赖; 同一浓度分别培养 24、48、72 h, 与 0 mg/mL 香菇多糖组比较, 香菇多糖组的抑制作用显著 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 说明给

药后细胞活性受到明显抑制,增殖能力受到显著影响。因此,后续实验中我们选取48 h作为时间点,在不同浓度设置下,进一步探究香菇多糖的抗肿瘤作用机制。

随后,研究香菇多糖对SHG-44细胞周期的影响。研究发现,香菇多糖组细胞周期有显著的变化,G0/G1期显著增加,S期明显降低($P < 0.01$),说明香菇多糖可通过调控细胞周期来抑制肿瘤细胞的增殖能力。因此,进一步检测处理48 h时,2.295 mg/mL香菇多糖对细胞凋亡的影响。

利用显微镜常光下观察到药物对SHG-44细胞形态有很大影响,细胞呈串珠状,浓度明显低于对照组。通过DAPI染色,在荧光显微镜下观察细胞核中有凋亡小体出现。进一步用Annexin V-FITC/PI双染检测细胞凋亡情况,经分析得出香菇多糖能够诱导细胞发生凋亡,但并未表现出显著性差异。

最后,通过划伤愈合实验和显微镜分析观察药物对细胞迁移能力的影响,结果发现,0 mg/mL香菇多糖组细胞明显向划伤处迁移生长;而2.295 mg/mL香菇多糖组细胞密度稀疏,不但不向划伤处生长,反而划伤区域面积显著增加($P < 0.01$)。可能通过抑制SHG-44细胞的迁移作用来控制肿瘤的发生和发展。

综上所述,本实验对香菇多糖对神经胶质瘤SHG-44细胞的抗肿瘤作用进行研究,结果发现其抗肿瘤作用明显,机制是可能通过对SHG-44细胞G0/G1期阻滞,影响细胞活力,抑制细胞增殖,并一定程度的诱导肿瘤细胞进行程序性凋亡;另一方面,还能抑制肿瘤细胞的迁移,达到减缓肿瘤细胞向外扩散的作用。同时,依据近年来研究成果,香菇多糖很有可能参与机体免疫系统的调控^[28]。因此,香菇多糖抗肿瘤作用机制的相关研究值得更深入探索,对以香菇多糖为主要成分的保健食品、新型抗肿瘤药物及相关特殊疾病临床辅助用药的研发具有重要的理论指导意义。

参考文献:

[1] 万茜淋,任雨贺,刘淑莹.香菇多糖的药理活性研究进展[J].中国药房,2018,29(8):1140-1144.
[2] Chihara G, Maeda Y, Hamuro J, et al. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing[J]. *Nature*, 1969, 222(5194): 687-688.
[3] Wu X, Li Y, Wan X, et al. Down-regulation of neogenin accelerated glioma progression through promoter methylation and its overexpression in SHG-44 induced apoptosis[J]. *PLoS One*,

2012, 7(5): e38074.

[4] 吴新民,赵刚,许万震,等. Neogenin表达下调与神经胶质瘤发生、发展的关系[J].中国神经肿瘤杂志,2013,11(1):8-14.
[5] 李石军,王凯平,汪柳,等.香菇多糖LNT₂的提取分离纯化、结构及体外抗肿瘤活性研究[J].中草药,2014,45(9):1232-1237.
[6] 邹林武,赵谋明,游丽君.香菇多糖提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2013,34(19):177-182.
[7] 马倩,蒲燕,袁文清,等.香菇多糖对慢性应激抑郁模型小鼠的抗抑郁作用及可能机制研究[J].中国免疫学杂志,2015,31(3):329-333.
[8] 王丽芹.香菇SD-08菌株多糖及其降解产物的提取、结构及抗氧化抗衰老活性研究[D].泰安:山东农业大学,2015.
[9] 侯爱萍,张树梅.香菇多糖抗菌抗病毒普适性研究[J].药学研究,2015,34(4):199-201.
[10] 于纯森,于栋华,国立东,等.食用菌多糖抗辐射损伤作用研究进展[J].食用菌,2015,37(21603):1-5.
[11] 徐晓飞.香菇多糖L2的免疫调节机理研究[D].广州:华南理工大学,2014.
[12] Shi J, Wei P K. Interleukin-8 does not influence proliferation of the SGC7901 gastric cancer cell line[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(6):2475-2480.
[13] 李红艳,赵雨,张惠,等.人参蛋白对Hep-2细胞增殖影响的比较[J].中国民族民间医药,2010,19(1):33-34.
[14] Luo K W, Yue G G, Ko C H, et al. *In vivo* and *in vitro* anti-tumor and anti-metastasis effects of *Coriolus versicolor* aqueous extract on mouse mammary 4T1 carcinoma[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(8-9):1078-1087.
[15] 刘丽芳,邱芳华,杨泽填,等.蛇葡萄素对皮离蛋白过表达的大肠癌LoVo细胞迁移和侵袭能力的抑制作用研究[J].中国药房,2018,29(22):3053-3058.
[16] 刘娜,张敏,宋莹,等.香菇原生质体杂交后代的遗传分析[J].江苏农业科学,2018,46(17):106-109.
[17] 李宜真.香菇多糖联合CAG方案治疗老年急性髓系白血病患者效果分析[J].中国实用医药,2018,13(29):89-91.
[18] 吴翠焕,史文鹏,黄金定,等.护理干预对香菇多糖联合顺铂治疗肺癌合并心包积液患者的感染及预后的影响[J].肿瘤药学,2018,8(4):649-652.
[19] 杨华,罗永忠,周文伟,等.香菇多糖联合博来霉素治疗恶性胸腔积液的疗效观察[J].临床合理用药杂志,2018,11(25):69-70.
[20] 刘洪千,林宗斌.香菇多糖联合顺铂治疗肺癌胸腔积液的疗效及对凋亡分子、血管新生指标表达的影响[J].临床和实验医学杂志,2018,17(2):141-144.
[21] 王俊.香菇多糖的结构与抗肿瘤活性的关系研究[D].武汉:华中科技大学,2012.
[22] 田汝华,沈小玲,周娟,等.喘可治和香菇多糖注射液在细胞和荷瘤裸鼠水平增效紫杉醇的抗肿瘤作用研究[J].中南药学,2017,15(6):750-754.
[23] Suga Y, Takehana K. Lentinan diminishes apoptotic bodies in

- the ileal crypts associated with S-1 administration[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 55-60.
- [24] Ahn H, Jeon E, Kim J C, et al. Lentinan from shiitake selectively attenuates AIM2 and non-canonical inflammasome activation while inducing pro-inflammatory cytokine production [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1314.
- [25] Liu Q, Dong L, Li H, et al. Lentinan mitigates therarubicin-induced myelosuppression by activating bone marrow-derived macrophages in an MAPK/NF- κ B-dependent manner [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 315-323.
- [26] 曾炫皓, 章强强. 真菌提取物抗肿瘤研究进展[J]. *中国真菌学杂志*, 2017, 12(3): 184-192.
- [27] Liu W, Gu J, Qi J, et al. Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(8): 1949-1955.
- [28] Shivahare R, Ali W, Singh U S, et al. Immunoprotective effect of lentinan in combination with miltefosine on Leishmania-infected J-774A. 1 macrophages [J]. *Parasite Immunol*, 2016, 38(10): 618-627.

β -榄香烯联合吉非替尼对肺癌细胞 A549 肿瘤干性的影响

张 浩¹, 卓诗勤^{2,3}, 金蓉蓉¹, 王晓艳¹

[1. 台州市中医院, 浙江 台州 318000; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 3. 鸿运华宁(杭州)生物医药有限公司, 浙江 杭州 310053]

摘要: 目的 探讨 β -榄香烯联合吉非替尼对肺癌细胞 A549 肿瘤干性的影响。方法 采用 MTS 法检测 β -榄香烯联合吉非替尼对肺癌细胞活性的作用; Transwell 检测细胞侵袭能力; 细胞划痕检测细胞迁移能力; 流式细胞检测细胞凋亡、细胞周期; Western blot 检测上皮-间质转化相关标记分子 (E-Cadherin、N-Cadherin、ZEB1、Vimentin)。结果 榄香烯浓度在 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 内对肺癌细胞 (A549、H522、H1299、PC-9) 活性无显著影响。与对照组比较, β -榄香烯 (40 $\mu\text{g/mL}$) 联合吉非替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 能显著抑制 A549 细胞活性 ($P<0.01$); 降低 S 期细胞比例 ($P<0.05$), 但不影响 A548 细胞凋亡, 抑制 A549 细胞的侵袭与转移 ($P<0.05$, $P<0.01$), 上调 E-Cadherin 蛋白表达, 下调 N-Cadherin、ZEB1、Vimentin 蛋白表达 ($P<0.01$)。结论 榄香烯 ($\geq 50 \mu\text{mol/L}$) 能抑制肺癌细胞增殖, 呈剂量依赖; β -榄香烯 (40 $\mu\text{g/mL}$) 联合吉非替尼抑制肺癌细胞的侵袭、转移及上皮-间质转化 (EMT)。

关键词: β -榄香烯; 吉非替尼; 肺癌; 肿瘤干性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)11-2619-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.013

Effects of β -elemene combined with gefitinib on tumor stemness of lung cancer cell A549

ZHANG Hao¹, ZHUO Shi-qin^{2,3}, JIN Rong-rong¹, WANG Xiao-yan¹

[1. Taizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taizhou 318000, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. Hongyun Hualing (Hangzhou) Biological Medicine Ltd. Com., Hangzhou 310053, China]

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of β -elemene combined with gefitinib on tumor stemness of lung cancer cell A549. **METHODS** The effect of β -elemene combined with gefitinib on the activity of lung cancer cells was detected by MTS assay; on the invasion ability of cells was by transwell; on cell migration ability was by cell scratches; on apoptosis and cell cycle was by flow cytometry; and on Epithelial-mesenchymal transition-related marker molecule expression (E-Cadherin, N-Cadherin, ZEB1, Vimentin) was by Western blot. **RESULTS** Within the concentration range of 0~50 $\mu\text{mol/L}$, β -elemene showed no significant effect on the activity of lung

收稿日期: 2018-07-02

基金项目: 2017 年台州市椒江区科技计划项目 (172062)

作者简介: 张 浩 (1989—), 男, 硕士, 中药师, 从事中药药理学及新产品开发研究。E-mail: zhanghao01726@163.com