基础研究 文章编号：0253-3626（2011）05-0572-03

香菇多糖的体外抗肿瘤活性研究

王 嵘[1]，易 敏[2]，潘贤英[1]
（青海省肿瘤医院 1. 肿瘤放疗科；2. 病理科，西宁 810007）

【摘 要】目的：研究香菇多糖体外抗肿瘤活性。方法：MTT 法观察香菇多糖对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的影响，流式细胞术分析其对 SGC-7901 细胞周期的影响，Western blot 法检测其对 $ERK_{1/2}$ 蛋白激酶磷酸化的作用。结果：香菇多糖能够显著抑制 SGC-7901 胃癌细胞的生长。香菇多糖作用于 SGC-7901 胃癌细胞后能够引起 S 期细胞周期阻滞，激活 $ERK_{1/2}$ 磷酸化。结论：香菇多糖具有体外抗肿瘤活性，其作用机制可能与诱导细胞周期阻滞和激活 $ERK_{1/2}$ 信号通路有关。

【关键词】香菇多糖；肿瘤；细胞周期；$ERK_{1/2}$
【中国图书分类法分类号】R694.13 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-20

Bioactivity study of lentinan on SGC-7901 cells growth in vitro

WANG Rong[1], *YI Min*[2], *PAN Xian-ying*[1]
(*1. Department of Radiation Oncology; 2. Department of Pathology, the Cancer Hospital of Qinghai Province*)

【Abstract】*Objective*: To investigate inhibitory effects of lentinan on human tumor SGC-7901 cells growth in vitro. *Methods*: The potential effect of lentinan on the cell viability was examined using MTT assay. The cell cycle distribution of SGC-7901 cells treated with lentinan was analyzed by flow cytometry. Phosphorylation of $ERK_{1/2}$ was detected by Western blot. *Results*: Lentinan strongly inhibited the SGC-7901 cells growth. Lentinan induced S phase cell cycle arrest and activated $ERK_{1/2}$ phosphorylation in SGC-7901 cells. *Conclusion*: The anti-tumor activity of lentinan might be attributed partly to the induction of cell cycle arrest through $ERK_{1/2}$ signal pathway.

【Key words】lentinan; tumor; cell cycle; $ERK_{1/2}$

香菇多糖是从优质香菇子实体中提取的有效活性成分，香菇的主要成分是多糖类和不饱和脂肪酸，还含有大量的可转变为维生素 D 的麦角甾醇和菌甾醇，经热水提取的香菇多糖可调节人体内有免疫功能的 T 细胞活性，可降低甲基胆蒽诱发肿瘤的能力。香菇还含有双链核糖核酸，能诱导产生干扰素，具有抗病毒能力[1]。本实验旨在观察香菇多糖体外抗肿瘤活性，探讨其对胃癌细胞株 SGC-7901 的作用机制，为新药开发和临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 二氧化碳培养箱（美国 Forma 公司）；Thermo Multiskan MK3 酶标仪（美国 Thermo 公司）；5417R 型台式高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；F-4500 紫外分光光度计（日本 Hitachi 公司）；FACS Calibur 流式细胞仪（美国 Becton Dickinson 公司）；半干转印仪（美国 Bio Rad 公司）。

1.1.2 试剂及药品 RPMI1640 培养基（美国 Gibco 公司）胎牛血清（FBS，杭州四季青公司）；$ERK_{1/2}$ 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司）；PVDF 膜（美国 Bio Rad 公司）；化学发光检测试剂（美国 Pierce 生物技术公司）；二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）、噻唑蓝（Thiazolyl blue，MTT）、碘化丙啶（Propidium iodinate，PI）和 RNase 以及其他常用生物试剂（美国 Sigma 公司）。香菇多糖由上海中医药大学中药研究所从香菇中分离提取，结构主要经 NMR、MS 光谱鉴定，纯度 95%以上。香菇多糖用培养基配成 100 μg/ml 的储存液，使用前用培养基稀释到所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞株购自中科院上海生化细胞所细胞库。SGC-7901 细胞用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养，取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长 细胞接种于 96 孔板内，待细胞贴壁后加入不同浓度的香菇多糖，每个浓度设 3 个复孔，并设相应浓度的溶媒对照及无细胞调零孔。药物与细胞共孵育 48 h 后加入 MTT，置培养箱中反应 4 h，弃去孔中培养基和 MTT 后加入 100 μl 的 DMSO，震荡溶解生成的紫色结晶后立即用酶标仪测定吸光度（OD 值），测定波长为 570 nm，

作者介绍：王 嵘（1975-），男，主治医师，
研究方向：肿瘤的三维适形放射治疗。

校正波长为 630 nm，所得值再减去空白的吸光度。按照公式（$1-OD_{处理组}/OD_{对照组}$）×100% 计算肿瘤生长抑制率。

1.2.3 流式细胞术分析细胞周期 细胞经香菇多糖处理一定时间后，胰酶消化收集细胞，4℃固定在预冷的 70%乙醇中。检测前离心弃去固定液，用 PBS 洗 2 遍后，将细胞重悬在含 50 mg/L RNase 和 50 mg/L PI 的 PBS 中，调整细胞数为 1×10^6 个/ml，室温置暗处染色 30 min，300 目尼龙膜过滤后用流式细胞仪检测 DNA 含量，采用 ModiFit 软件进行细胞周期分析。

1.2.4 Western blot 蛋白质印迹分析 细胞经香菇多糖处理一定时间后，加入 RIPA 缓冲液裂解，测定总蛋白含量。取等量蛋白样品加入上样缓冲液 99℃变性 15 min 后，以 10% SDS-PAGE 胶电泳，用半干法将胶上的蛋白电转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜用含 5%的脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭后，加一抗[Phospho-p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)(197G2)Rabbit mAb，美国，#4377，1:1 000；p44/42 MAP Kinase(137F5)Rabbit mAb，美国，#4695，1:1 000]于 4℃孵育过夜，再与标记有辣根过氧化物酶的二抗[Anti-Rabbit IgG(whole molecule)-Peroxidase antibody produced in goat，美国，#A6154，1:10 000]室温孵育 1 h。过氧化物酶活性用增强型化学发光检测系统检测。

1.3 统计学处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$的形式表示，应用方差分析后成对双尾 t 检验两两比较检测不同药物处理组和空白对照组之间的差异，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测香菇多糖对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞活性的影响

不同浓度的香菇多糖（高、中、低剂量组）处理人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞 48 h 后，用 MTT 法检测细胞的活性。结果显示，香菇多糖能够强烈抑制 SGC-7901 细胞，抑制率随着浓度增大而增大(见表 1)，并测得其 IC_{50} 值分别为(25.00±0.32) μg/ml。

表 1 香菇多糖对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞活性的影响

组别	药物浓度（μg/ml）	平均生长抑制率（%）
对照组	0	-
香菇多糖（高）	50	70.0±8.3**
香菇多糖（中）	30	41.0±4.7**
香菇多糖（低）	5	27.5±3.9*

注：与阴性对照组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

2.2 香菇多糖对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞周期的影响

流式结果采用专业处理软件 Moditfit 3.0 统计分析。分析结果显示，SGC-7901 细胞经 25 μg/ml 香菇多糖处理后，细胞 S 期细胞增多，和对照组相比香菇多糖处理 SGC-7901 细胞 24 h 和 48 h 后，G_1 分别增加 1.51%和减少 12.28%，G_2 期细胞分别减少 4.74%和 3.85%，S 期细胞分别增多了 3.23%和 16.13%，表明香菇多糖处理可使 SGC-7901 细胞阻滞于 S期，且作用时间越长周期阻滞效果越显著（图 1）。

2.3 香菇多糖对人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞 $ERK_{1/2}$ 磷酸化的影响

SGC-7901 细胞经 25 μg/ml 香菇多糖处理后，用 Western blot蛋白质印迹分析法检测磷酸化 $ERK_{1/2}$，总 $ERK_{1/2}$ 的蛋白表达，结果显示香菇多糖作用 0.125、0.25、1、2 h 后，显著抑制 SGC-7901 细胞 $ERK_{1/2}$ 磷酸化，而对总 $ERK_{1/2}$ 没有影响。$ERK_{1/2}$ 磷酸化水平在香菇多糖作用 0.25 h 后开始升高，作用 1 h 时达高峰（图 2）。

3 讨 论

香菇多糖又称香蕈，系自担子菌纲伞菌目伞菌科香菇菌属香菇菌，香菇是我国传统的著名食用菌，在世界上最早人工驯化栽培[2]。其中含有十多种氨基酸，其中有异亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、缬氨酸等 7 种人体必需的氨基酸，还含有维生素 B_1、B_2、PP 及矿物盐。香菇多糖功能主治：为 T 淋巴细胞的特异性免疫佐剂，能增强对抗原刺激的免疫反应，使受抑制的辅助性 T 淋巴细胞的功能恢复，可对抗环磷酰胺的免疫抑制作用。另本品具有护肝作用，对移植性肿瘤有抗瘤作用。临床多用于急慢性白血病、胃癌、肺癌等多种肿瘤的辅助治疗，常与化疗药物合用。具有减轻化疗药物的毒性、缓解症状、提高患者低下的免疫功能、防止癌细胞转移、纠正微量元素失调等作用。不能手术或复发性胃癌、肝癌、膀胱癌，使用本品能缓解症状，提高病人免疫功能，纠正微量元素失调[3]。香菇多糖的抗肿瘤作用主要是通过增强宿主免疫功能来实现的，与其具有类似功能的还有牛膝多糖和人参多糖等。至于有效成分方面，国内外目前对于香菇多糖的研究已经正在从细胞水平逐步向分子水平发展。

恶性肿瘤是以细胞异常分化与生长为特征的一类疾病。普遍认为肿瘤由内外因共同作用引起，细胞周期调控的异常即属于内因的一种。真核细胞细胞周期的进展需要大量的胞内外信号的配合，如果缺少适当的信号，细胞将不能从一个阶段转向下一个阶段，这个点称为检定点，这种现象称为周期阻滞。抗肿瘤作用主要机制之一是诱导肿瘤细胞周期阻滞，与细胞周期阻滞密切相关的参与调控细胞周期的蛋白和基因有许多，如丝裂原活化蛋白激酶和肿瘤抑制基因 p53[4]。P53 蛋白对高危癌前病变的 DNA 损伤可直接或通过调控其他途径进行修复，使其恢复正常；对 DNA 损伤无法修复的细胞，P53 蛋白则诱导其进入冬眠状态或细胞凋亡，预防细胞癌变。从细胞外刺激作用于细胞，至细胞出现相应的生物学效应，须通过 MAPK 信号转导通路的三级激酶级联反应。细胞外调节蛋白激酶包括 ERK_1 和 ERK_2，是将信号从表面受体传导至细胞核的关键。磷酸化激活的 $ERK_{1/2}$ 由胞质转位到核内，进而介导 Elk-1、ATF、NF-κB、Ap-1、c-fos 和 c-Jun 的转录活化，参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构