

灵芝菌丝体多糖对 HL-60 细胞凋亡的影响

胡映辉, 林志彬*

(北京医科大学基础医学院药理学系, 北京 100083)

摘要 目的:研究灵芝菌丝体粗总多糖(MGLP1)、总多糖(MGLP2)对 HL-60 细胞凋亡的影响。方法: MGLP1, MGLP2 与 HL-60 细胞共培养, MTT 法检测 MGLP1, MGLP2 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用;琼脂糖凝胶电泳法和流式细胞检测法定性定量检测细胞凋亡。MGLP1, MGLP2 作用于小鼠脾细胞,再将共培养上清液(MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM)作用于 HL-60 细胞,同法定性定量检测它们对 HL-60 细胞凋亡的诱导作用。结果: MGLP1, MGLP2 在体外对 HL-60 细胞的增殖无明显的抑制作用,且不能明显的诱导 HL-60 细胞凋亡。但 MGLP1, MGLP2 作用于脾细胞的共培养上清液却可以明显的诱导 HL-60 细胞凋亡。结论: MGLP1, MGLP2 无直接促进 HL-60 细胞凋亡作用,但可通过脾细胞间接诱导 HL-60 细胞凋亡。

关键词 灵芝; 多糖; 菌丝体; HL-60 细胞; 脾细胞; 细胞凋亡

国内外学者已证明从灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr) Karst] 的子实体和菌丝体中提取的多糖成分有抗肿瘤活性,并推测灵芝多糖的抗肿瘤活性是宿主介导的,即通过增强机体的免疫功能而实现的。少数报道指出,灵芝多糖在体外可直接抑制肿瘤细胞株的增殖^[1-3]。为进一步探讨灵芝多糖的抗肿瘤机制,本文用体外培养体系,分析了灵芝菌丝粗总多糖(MGLP1)、总多糖(MGLP2)对 HL-60 细胞凋亡的直接作用和通过脾细胞对 HL-60 细胞的间接作用。

材 料 与 方 法

动物 ♂ Balb/c 小鼠,体重 18 ~ 22 g(北京医科大学实验动物部提供)。

药品与试剂 灵芝菌丝体粗总多糖(MGLP1)、总多糖(MGLP2)均由北京医科大学药学院中药研究室提供。MGLP1 为含蛋白多糖,蛋白含量约 56%, MGLP2 为去蛋白多糖,内含 10 个多糖均一体,分子量范围 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 。两者均为水溶性,淡黄色粉末。用完全 RPMI-1640 培养液配成 $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤器过滤除菌, 4°C 保存,临用前用完全 RPMI-1640 培养液稀释到所需浓度。

足叶乙甙(VP-16): 江苏连云港制药厂。刀豆蛋白 A(Con A): Sigma 公司产品。蛋白酶 K: Merk 公司产品。胰 RNA 酶岳泰公司产品。

细胞培养 人白血病 HL-60 细胞培养在完全 RPMI-1640 培养液中,置 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱, 2 ~ 3 d 传代 1 次。

HL-60 细胞的抑制试验 按 Mosmann^[4]方法,略有改动。指数生长的 HL-60 细胞,以 $2 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度接种于 96 孔培养板,每孔 $100 \mu\text{l}$ 。然后每孔分别加入不同浓度的 MGLP1, MGLP2 及阳性对照药(VP-16) $100 \mu\text{l}$ 。对照组用 RPMI-1640 代替。 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱培养 68 h,取出,每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的噻唑蓝(MTT) $20 \mu\text{l}$,继续孵育 4 h。 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清液,每孔加入酸化异丙醇 $150 \mu\text{l}$,充分溶解,振荡后测每孔 570 nm 的 A 值。

脾细胞加药培养上清液(MGLP1, MGLP2 splenocyte conditioned media, MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM)制备 无菌取脾,制成单细胞悬液,调整细胞浓度至 $2 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$,加入 24 孔培养板,每孔 1 ml,再分别加入 Con A $500 \mu\text{l}$,使其终浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,同时加入不同浓度的 MGLP1, MGLP2 各 $500 \mu\text{l}$,对照组用等体积的 RPMI-1640 代替。置 $5\% \text{ CO}_2$, 37°C 培养箱培养 3 d。取出培养板, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液, $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, -20°C 贮存待用。

细胞凋亡的诱导 指数生长期的细胞,调整细

胞的初浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$, 加入不同浓度的 MGLP1, MGLP2, 阳性对照组加入等体积的 VP-16, 对照组用等体积 RPMI-1640 代替; 不同浓度的 MGLP1, MGLP2 与脾细胞共培养上清液 (MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM) 以 20% (v/v) 加入初浓度为 $1 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ HL-60 细胞培养基中, 对照组用正常的脾细胞培养上清液 (NS-CM) 代替, 另设等体积的 RPMI-1640 组为阴性对照, 置 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 72 h, 提取细胞 DNA。琼脂糖凝胶电泳, 定性检测凋亡条带即“DNA ladder”, 流式细胞术定量鉴别亚二倍体细胞 (凋亡细胞) 含量。

细胞总 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳检测 药物或培养上清液处理后的 HL-60 细胞 3×10^6 个, $800 \times \text{g}$ 离心 5 min, 弃上清液。PBS 洗涤两遍。加入 DNA 抽提缓冲液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl, pH 8.0; $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA; 0.4% SDS) 0.5 ml, 移入 Eppendorf 管, 加入蛋白酶 K, 终浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 充分混匀, 50°C 水浴保温 3 h, 不时振摇。取出, 加入等体积 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris·HCl (pH 8.0) 平衡的酚, 缓慢来回颠倒 10 min, 室温 $5000 \times \text{g}$ 离心 15 min。吸出上清液于另一离心管中, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 充分混匀, $5000 \times \text{g}$ 离心 15 min。吸出上清液, 加入 2 倍体积无水乙醇及 10% 体积 NaAc (pH 5.2), -20°C 过夜。室温 $12000 \times \text{g}$ 离心沉淀 DNA, 70% 乙醇洗 1 次后, 室温干燥, 适量 TE 溶解, 加 RNA 酶 20 μg , 37°C 水浴 1 h。取制备的 DNA 样品, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳约 2 h, 电泳缓冲液为 TBE。紫外灯下观察“DNA ladder”并摄影。

流式细胞仪分析凋亡细胞 收集药物处理后的 HL-60 细胞, 离心, 去上清液, PBS 洗两次。 4°C , 75% 乙醇固定 24 h 以上, 离心洗涤细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ 。用 PI 染液 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ propidium iodide, 0.1% sodium citrate, 0.1% triton X-100) 染色。用 FACScan (Becton Dickinson) 分析亚二倍体细胞 (凋亡细胞) 含量。

统计学处理 所有结果的显著性均采用 Duncan's test, ANOVA, SAS 6.04 软件进行分析处理。

结 果

1 MGLP1, MGLP2 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用

MGLP1 在 $5.9 \sim 750 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的范围内对 HL-60 细胞的增殖无明显的抑制作用, MGLP2 只在 $185.7, 375$ 和 $750 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 较高浓度范围内, 对 HL-60 细胞的增殖有一微弱的抑制作用 (表 1)。

Tab 1 Effects of MGLP1 and MGLP2 on HL-60 cell proliferation *in vitro*

Group	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Absorbance
RPMI-1640	-	1.045 ± 0.093
MGLP1	5.90	1.165 ± 0.168
	11.75	1.168 ± 0.167
	23.50	1.125 ± 0.116
	47.00	1.050 ± 0.073
	93.75	1.050 ± 0.033
	187.50	1.073 ± 0.041
	375.00	1.018 ± 0.022
MGLP2	750.00	1.175 ± 0.056
	5.90	0.970 ± 0.055
	11.75	0.973 ± 0.034
	23.50	1.105 ± 0.092
	47.00	0.983 ± 0.029
	93.75	0.955 ± 0.037
	187.50	$0.910 \pm 0.022^*$
VP-16	375.00	$0.845 \pm 0.031^{**}$
	750.00	$0.865 \pm 0.150^{**}$
	20.00	$0.625 \pm 0.026^{**}$

$n=4, \bar{x} \pm s$. Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs RPMI-1640.

2 MGLP1, MGLP2 对 HL-60 细胞凋亡的影响

2.1 琼脂糖凝胶电泳法检测

如图 1 所示, MGLP1 和 MGLP2 浓度在 150 和 $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 对 HL-60 细胞作用 72 h, 其 DNA 降解不明显, 未见明显的“DNA ladder”; 而 VP-16 20, 40 及 $80 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 作用于 HL-60 仅 6 h, 在图中即可见到明显的“DNA ladder”, 第 1 条条带约为 180 bp, 依次倍增, 说明 DNA 在核小体处断裂, 细胞发生凋亡。

2.2 流式细胞术检测

细胞固定后, 降解的 DNA 被释放, 因此, 检测时在正常二倍体细胞 DNA 峰 (G1 峰) 之前出现一峰, 称 AP 峰。根据 AP 峰的高低可以推测发生凋亡的细胞数。由表 2, 可以看出 MGLP1 或 MGLP2 $600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 作用于 HL-60 细胞 72 h, 有 $7.4\% \pm 1.0\%$ 和 $11.8\% \pm 2.2\%$ 的细胞发生凋亡, 其凋亡细胞虽略高于对照组。由于凋亡细胞含量较少, 故在 DNA 琼脂糖凝胶电泳上未见明显的“DNA ladder”, 而阳性对照组 $80 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ VP-16 作用于 HL-60 细胞 12 h, 有 $68.2\% \pm 38.3\%$ 的细胞发生凋亡。由此可见, MGLP1, MGLP2 不能直接作用诱导 HL-60 细胞的凋亡。

3 MGLP1-S CM 和 MGLP2-S CM 对 HL-60 细胞 DNA 凝胶电泳的影响

3.1 琼脂多糖凝胶电泳法检测

如图 2 所示:当 MGLP1 与 MGLP2 浓度为 50,100 及 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,与小鼠淋巴细胞共培养 3 d,培养上清液(MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM)可诱导 HL-60 细胞的凋亡,在 DNA 琼脂糖凝胶电泳上可见明显的“DNA ladder”,第 1 条带的位置在 180 bp 左右。

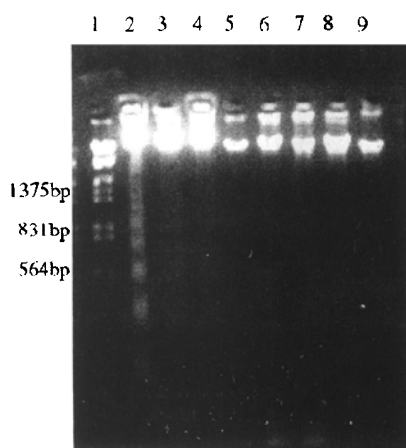


Fig 1 Agarose-gel-electrophoretic patterns of DNA isolated from HL-60 after having been treated with MGLP1 and MGLP2. 1. Marker; 2. 80 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ VP-16; 3. 20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ VP-16; 4. 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ VP-16; 5. 600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ MGLP2; 6. 150 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ MGLP2; 7. 600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ MGLP1; 8. 150 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ MGLP1; 9. RPMI-1640.

3.2 流式细胞仪检测

当 MGLP1 与 MGLP2 浓度为 50,100 及 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,与小鼠脾细胞共培养 3 d,培养上清液(MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM)使细胞凋亡发生率分别为 23.8% \pm 1.5%, 25.7% \pm 0.7%, 28.1% \pm 0.3% (MGLP1-S-CM); 25.8% \pm 0.8%, 29.4% \pm 1.5%, 32.4% \pm 0.9% (MGLP2-S-CM)。而正常上清液(N-S-CM)仅有 8.0% \pm 0.4% 的细胞发生凋亡(表 3)。可见一定浓度的 MGLP1 或 MGLP2 作用于小鼠脾细胞共培养上清液可明显增加 HL-60 凋亡细胞的百分比。提示该作用明显强于 MGLP1 及 MGLP2 对 HL-60 细胞的直接作用(见表 2),且药物浓度亦明显低。

Tab 2 Effects of MGLP1 and MGLP2 for 72 h on apoptosis of HL-60 cells *in vitro*

Group	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Apoptotic cell/ %
RPMI-1640	-	1.86 \pm 0.51
MGLP1	600	7.37 \pm 1.00*
MGLP2	600	11.81 \pm 2.20**
VP-16	80	68.23 \pm 3.83**

$n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs RPMI-1640.

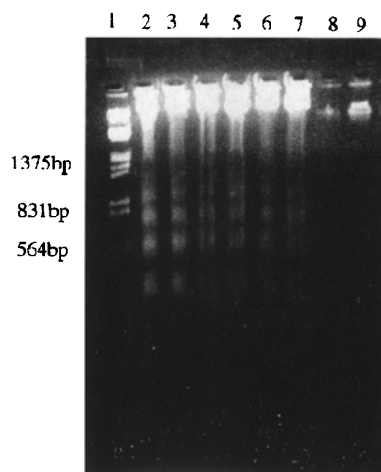


Fig 2 Agarose-gel-electrophoretic patterns of DNA isolated from HL-60 after having been treated with MGLP1-S-CM and MGLP2-S-CM. 1. Marker; 2. MGLP2-S-CM (200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 3. MGLP2-S-CM (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 4. MGLP2-S-CM (50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 5. MGLP1-S-CM (200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 6. MGLP1-S-CM (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 7. MGLP1-S-CM (50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$); 8. N-S-CM; 9. RPMI-1640.

Tab 3 Effects of MGLP1-S CM and MGLP2-S CM on HL-60 apoptosis *in vitro*

Group	Concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	n	Apoptotic cell/ %
RPMI-1640	-	4	1.86 \pm 0.51
N-S-CM	-	4	8.04 \pm 0.44 Δ
MGLP1-S-CM	50	4	23.84 \pm 1.53** $\Delta\Delta$
	100	4	25.67 \pm 0.65** $\Delta\Delta$
	200	4	28.05 \pm 0.31** $\Delta\Delta$
MGLP2-S-CM	50	3	25.77 \pm 0.78** $\Delta\Delta$
	100	3	29.39 \pm 1.53** $\Delta\Delta$
	200	3	32.41 \pm 0.89** $\Delta\Delta$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs RPMI-1640; ** $P < 0.01$ vs N-S-CM.

讨 论

真菌多糖作为一类低毒而免疫活性强的抗肿瘤物质,受到人们广泛注意。其中研究较多的有香菇 (*Lentinus edodes*) 多糖,云芝 (*Coriolus vericolor*) 多糖和灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 多糖^[1,2,5,6]。尽管目前有许多报道已证明从灵芝的子实体或菌丝体中提取的多糖在体内或体外能够抑制肿瘤的生长^[1~3],但其具体的抗肿瘤机制还远未清楚。体内外实验已证明灵芝多糖能够促进淋巴细胞增殖,促进淋巴细胞分泌 IL-2, INF- γ 以及增强小鼠体内 NK 细胞活性^[2,3,7],并认为这可能是灵芝多糖的抑瘤机制之一。但尚缺乏足够的证据表明这种免疫增强作用同抑瘤活性的关系。本文发现 MGLP1 体外即使在很高的浓度 ($600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 并不能抑制 HL-60 细胞的增殖,而 MGLP2 亦仅在较高的浓度才对 HL-60 细胞的增殖有较弱的抑制作用;且 MGLP1 和 MGLP2 亦不象许多细胞毒性抗肿瘤药(如 VP-16)那样通过诱导敏感细胞株的凋亡而发挥抗肿瘤作用^[8]。我们已证明 MGLP1, MGLP2 可使小鼠腹腔巨嗜细胞培养上清液中 TNF α 的活性增高,该培养上清液不仅抑制 HL-60 细胞的增殖并诱导 HL-60 细胞的凋亡^[9]。在此基础上,本文实验又证明 MGLP1, MGLP2 与脾淋巴细胞共培养后,其培养上清液同样能够诱导 HL-60 细胞的凋亡(图 2,表 3)。提示 MGLP1, MGLP2 作用的脾淋巴细胞培养上清液中的某些成分在诱导 HL-60 细胞的凋亡中发挥了作用。大量文献报道:灵芝多糖能够促进淋巴细胞分泌 IL-2, INF- γ 等细胞因子^[2,7]。有实验证明, INF- γ 在体外可直接抑制来源于乳腺和肠道及其它肿瘤细胞株的生长并可直接诱导 Hela 细胞的凋亡^[10,11]。IL-2 作为 T 淋巴细胞的生长和分化的促进因子,虽尚未见直接诱导肿瘤细胞株凋亡的报道,但 IL-2 能够促进 T 淋巴细胞合成和分泌 INF- γ ,继而诱导 CTL 前体细胞转变为活性 CTL。而 INF- γ 和 CTL 细胞均具有直接抑制肿瘤细胞的功能。因

而我们推测: MGLP1, MGLP2 通过促进淋巴细胞的功能,包括分泌一些活性物质(如细胞因子),诱导了 HL-60 细胞的凋亡。此途径可能与 MGLP1, MGLP2 的抑瘤作用有关。

致谢 本课题获泰国德恒裕(OSTSPA)有限公司赞助。

参 考 文 献

- 1 Sone Y, Okuda R, Wada N, *et al*. Structures and anti-tumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agr Biol Chem*, 1985, **49**: 2641
- 2 Ma L, Lin ZB, Li RZ, *et al*. Effects of *Ganoderma* polysaccharides on IL-2 production by mouse splenocytes *in vitro*. *J Beijing Med Univ*, 1991, **23**: 412
- 3 Won SJ, Lee SS, Ke YH, *et al*. Enhancement of splenic NK cytotoxic activity by extracts of *Ganoderma lucidum* mycelium in mice. *J Biomed Lsb Sci*, 1989, **2**: 201
- 4 Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, **65**: 55
- 5 李熙民,许良中. 比较两种云芝糖肽对外人癌细胞株的抗癌作用. 上海医科大学学报, 1987, **14**: 326
- 6 Suga T, Shio T, Maeda YY, *et al*. Anti-tumor activity of *Letinan* in murine syngenic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene induced carcinogenesis. *Cancer Res*, 1984, **44**: 5132
- 7 Lei LS, Lin ZB. Effect of *Ganoderma* polysaccharides on T cell subpopulations and production of interleukin 2 in mixed lymphocyte response. *Acta Pharm Sin*, 1992, **27**: 331
- 8 Hicknen BA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, **11**: 121
- 9 胡映辉,林志彬,何云庆. 灵芝菌丝体多糖通过小鼠腹腔巨嗜细胞诱导 HL-60 细胞凋亡. 中国药理学通报, 1999, (待发表)
- 10 Balkwill FR, Lee A, Aldam G, *et al*. Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons. *Cancer Res*, 1986, **46**: 3990
- 11 Volm M, Matern J. Isolation of Dap3, a novel mediator of interferon-gamma induced cell death. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 27932

EFFECTS OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM MYCELIA OF *GANODERMA LUCIDUM* ON HL-60 CELL APOPTOSIS

Hu Yinghui(Hu YH) and Lin Zhibin(Lin ZB)

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences,
Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT **AIM:** To study the effects of polysaccharides isolated from mycelium of *Ganoderma lucidum*(MGLP1 and MGLP2) on HL-60 cell apoptosis. **METHODS:** The *in vitro* effect of MGLP1 and MGLP2 on the proliferation of HL-60 cells were evaluated by MTT assay. DNA gel electrophoresis and flow-cytometric analysis were used to determine the apoptotic cells. **RESULTS:** MGLP1 did not show inhibition of HL-60 cell proliferation *in vitro*. When the concentrations of MGLP2 were at higher doses (187.5 ~ 750 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), it slightly inhibited HL-60 proliferation. Furthermore, MGLP1 and MGLP2 showed no effect on inducing HL-60 apoptosis even at a high dose of 600 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. However, the conditioned medium from MGLP1 and MGLP2 activated splenocytes (MGLP1-S-CM, MGLP2-S-CM) markedly induced HL-60 apoptosis. DNA gel electrophoresis showed obvious DNA “ladder”. Flow-cytometric analysis revealed that few 8.0% \pm 0.4% apoptotic cells were seen in the control cultures, while MGLP1-S-CM and MGLP2-S-CM treatment resulted in significant increase in the apoptotic population in the HL-60 28.1% \pm 0.3%, MGLP1-S-CM; 32.4% \pm 0.9%, MGLP2-S-CM). **CONCLUSION:** MGLP1 and MGLP2 showed no obvious effect on HL-60 cell proliferation and inducing HL-60 apoptosis *in vitro*, whereas MGLP1-S-CM and MGLP2-S-CM markedly induced HL-60 apoptosis.

KEY WORDS *ganoderma*; mycelium; polysaccharide; HL-60 cell; splenocyte; apoptosis