

• 论著 •

秦巴硒菇提取物硒蛋白多糖荷瘤药物血清促慢性红白血病细胞株 K562 凋亡的实验研究

楚惠媛¹, 陈 彻²

(1. 甘肃中医学院生命医学实验室, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院科研中心, 甘肃 兰州 730000)

【摘要】 目的: 探讨秦巴硒菇提取物硒蛋白多糖制备的含药血清对慢性红白血病细胞株(K562)凋亡的影响。方法: 建立荷瘤小鼠模型, 采用血清药理学方法制备硒蛋白多糖含药血清, 常规培养 K562 细胞。通过甲基噻唑基四唑(MTT)比色法检测硒蛋白多糖含药血清对肿瘤生长的抑制率, 用形态学和 DNA 电泳技术观察细胞凋亡的发生, 用比色法检测凋亡相关基因 caspase-3 的表达。结果: 秦巴硒菇提取物硒蛋白多糖含药血清可显著抑制 K562 细胞生长, 且呈时间-剂量依赖性。形态学、DNA 电泳结果均证实有凋亡发生, 与空白血清组比较, caspase-3 基因上调明显。结论: 秦巴硒菇提取物硒蛋白多糖含药血清可促进 K562 细胞凋亡, 其机制可能与上调 caspase-3 基因有关。

【关键词】 秦巴硒菇; 硒蛋白多糖; 细胞凋亡; caspase-3

中图分类号: R285.5; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)03-0142-04

Study on apoptosis of K562 cells induced by tumor-bearing herb serum of selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba selenium-mushroom (秦巴硒菇) CHU Hui-yuan¹, CHEN Che². 1. Laboratory of Life Medicine, 2. Scientific Research Center, Gansu Traditional Chinese Medical College, Lanzhou 730000, Gansu, China

【Abstract】 Objective: To explore the effect of selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba selenium-mushroom (秦巴硒菇) on apoptosis of K562 cells. **Methods:** Tumor-bearing mice model was established, and selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba selenium-mushroom (contained-herb serum) was prepared by the method of serum pharmacology. K562 cells were conventionally cultured. Growth inhibition rate of tumor cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Morphological changes of apoptotic cell were observed under a fluorescent microscope. Cell apoptosis was observed by DNA electrophoresis. Caspase-3 relative gene was measured by colorimetry. **Results:** Selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba selenium-mushroom could significantly inhibit the growth of K562 cells, there was a remarkably positive correlation between drug concentration, time and inhibitory rate. Apoptotic phenomenon was certain via morphological examination and DNA electrophoresis. Compared with control group, caspase-3 gene was markedly upregulated. **Conclusion:** Selenium-protein polysaccharide extracted from Qinba selenium-mushroom could induce apoptosis of K562 cells. The mechanism may be related to upregulation of caspase-3.

【Key words】 Qinba selenium-mushroom; selenium-protein polysaccharide; apoptosis; caspase-3

秦巴硒菇又名姬松茸 (*Agaricus blazei*), 系菌类植物的地上菌丝体, 属担子菌纲, 具有较高的营养价值和多种神奇的医疗保健功能, 尤其抗肿瘤效果优于目前已知的其他蕈菌^[1]。1993 年, 由中国科学院植物研究所采自巴西原始森林中的姬松茸菌种在我国福建省人工栽培成功, 2000 年又在我国第二大富硒区陕西省紫阳县秦巴山一带栽培成功, 故又名秦巴硒菇。姬松茸中的许多活性成分如类固醇、多

糖、糖蛋白复合物以及核酸等已被研究人员分离及提纯, 并证实姬松茸多糖具有抗肿瘤^[2-6]、提高机体免疫力^[7,8]、抗突变^[9,10]及杀菌等作用^[11,12]。硒是人和动物体内必需的微量元素, 体内不能自行合成, 必须由外界供给才能满足正常代谢需要。硒具有防止肿瘤发生、抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞分化、抑制细胞分裂, 使恶性表型逆转的作用^[13]。但对富含硒的秦巴硒菇的相关研究报道, 国内外尚未见到。本研究采取血清药理学方法制备荷瘤小鼠药物血清, 观察了秦巴硒菇提取物硒蛋白多糖(含药血清)在体外对肿瘤细胞凋亡的影响。

基金项目: 甘肃省教育厅自然科学基金资助项目(024-04)

作者简介: 楚惠媛(1964-), 女(汉族), 甘肃武威人, 实验师, 主要从事生物化学实验及分子生物学实验研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料: BALB/c 雄性小鼠购于兰州生物制品研究所, 合格证号: 医动字第 14-001 号; 秦巴硒菇由紫阳康源生物工程有限公司提供; Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 由美国 Invitrogen 公司出品; 新生胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; 甲基噻唑基四唑 (MTT)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、琼脂糖、核糖核酸酶 (Rnase)、溴化乙锭 (EB)、吖啶橙 (AO) 均由美国 Sigma 公司生产; 100 碱基对脱氧核糖核苷酸分子标记 (100 bp DNA Ladder Marker) 由美国 Promega 公司出品; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 硒蛋白多糖的提取: 硒蛋白多糖的提取流程见图 1。

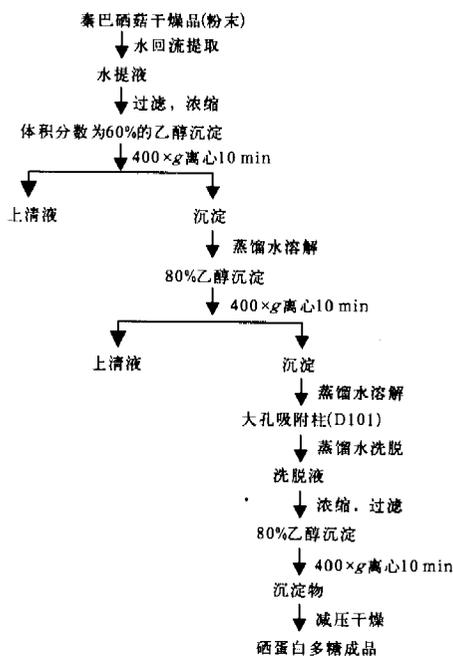


图 1 硒蛋白多糖的提取流程

Figure 1 Extraction procedure of selenium-mushroom

1.2.2 荷瘤小鼠模型和含药血清的制备: BALB/c 雄性小鼠 30 只, 取冻存的肉瘤细胞株 S180 在小鼠腹腔传代 3 次, 抽取第 4 代生长最佳状态的细胞, 用苔盼蓝拒染, 细胞成活率在 95% 以上, 配肉瘤细胞株 S180 按细胞数 1×10^9 个/L 向每只小鼠腹腔内注射 0.2 ml 的肉瘤细胞株 S180, 24 h 后按随机数字表法分为 3 组, 每组 10 只。硒蛋白多糖大剂量 (0.10 g/kg) 组和硒蛋白多糖小剂量 (0.05 g/kg) 组每日灌胃硒蛋白多糖 1 次, 连续 10 d (灌胃前禁食 8~12 h); 生理盐水组给予生理盐水的途径、剂量、

方法、次数与硒蛋白多糖组相同。末次给药 1 h 后, 摘小鼠眼球取内眦动脉血, 无菌分离血清, 经 56 °C 灭活处理 30 min 后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20 °C 冻存备用。

1.2.3 细胞培养: 慢性红白血病细胞株 (K562) 由本院科研中心细胞生物研究室传代保存。常规培养, 培养液为含体积分数为 10% 的新生胎牛血清, 青、链霉素各 100 kU/L 的 DMEM, 在 37 °C、饱和湿度、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱中传代培养, 2~3 d 换液 1 次, 选取对数生长期细胞用于实验。

1.2.4 MTT 比色法: 将 K562 细胞悬液调整为 2×10^8 /L, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μl。实验组加入体积分数为 10% 的含药血清培养液, 对照组加 10% 的空白无药血清培养液, 另设调零孔 (只有培养基, 无细胞), 每组 8 个复孔。全湿条件下, 37 °C、10% CO₂ 培养箱中培养, 于 24、48 和 72 h 在各孔中加入 MTT 10 μl, 继续培养 4 h; 每孔加入质量分数为 10% 的 SDS 100 μl 终止培养, 37 °C 过夜; 用酶联免疫检测仪测定各孔在波长 490 nm 处的吸光度 (A₄₉₀) 值, 按下式计算细胞抑制率 (IR)。

$$IR(\%) = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

1.2.5 荧光显微镜观察: AO 荧光染色检查细胞染色质和 RNA 变化。取实验组及对照组细胞悬液, 吹打均匀, 细胞数调至 2×10^8 个/L, 取 30 μl 悬液加到载玻片上, 加 10 μl AO 染色, 加盖玻片后置荧光显微镜 (波长 250~350 nm) 下观察 K562 细胞形态并行凋亡细胞 (细胞膜起泡、核固缩、核边集、核碎裂及形成凋亡小体) 计数, 每张玻片观察 200 个细胞, 每组观察 4 张玻片, 按下式计算凋亡率。

$$\text{凋亡率}(\%) = (\text{凋亡细胞数}/200) \times 100\%$$

1.2.6 DNA 电泳: 各组收集约 1×10^6 个细胞, 经磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 加入细胞裂解液和蛋白酶 K, 混匀, 于 37 °C 水浴至混合物变清亮; 在台式高速离心机中以室温 $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 将上清液移至另一洁净的微量离心管中, 用等体积苯酚: 氯仿 (1:1)、苯酚: 氯仿: 异丙醇 (25:24:1) 和氯仿各抽提 1 次, 上清中加入 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠和 2 倍体积冷乙醇, 于 -20 °C 下过夜; 次日于 -10 °C、 $10\,000 \times g$ 离心 10 min, 收集沉淀, 将沉淀溶于 20 μl 三羟甲基氨基甲烷盐酸/乙二胺四乙酸 (TE) 缓冲液; 加入 1 μl RNase, 37 °C 温浴 1 h 后加入含 EB 的琼脂糖凝胶 (质量分数为 1.5%) 孔中; 另加 DNA Marker 作参照, 于三羟甲基氨基甲烷乙酸 (TAE) 缓冲液中室温、恒压、恒流电泳 1~2 h, 紫外

表 1 硒蛋白多糖含药血清对 K562 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Inhibition of K562 cells proliferation by selenium-protein polysaccharide herb-contained serum ($\bar{x} \pm s, n=8$)

10%的 含药血清	24 h		48 h		72 h	
	A 值	IR (%)	A 值	IR (%)	A 值	IR (%)
空白	0.578±0.083	0	0.880±0.016	0	1.099±0.013	0
0.05 g/kg	0.524±0.012 [△]	9.34	0.728±0.019 [△]	17.27	0.828±0.013 [△]	24.66
0.10 g/kg	0.504±0.047 [△]	12.80	0.504±0.013 [△]	42.73	0.547±0.017 [△]	50.23

注:与空白比较;[△]P<0.01

线透射反射分析仪下观察电泳条带并拍照。

1.2.7 caspase-3 活性检测:参照文献[14]方法检测。不同浓度硒蛋白多糖(10%含药血清)作用 12、24 和 48 h 后,分别收集 2×10^6 个细胞,同时设对照组和调零孔。加入冷细胞裂解缓冲液后置于冰上 10 min,4 ℃下 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min;上清加入 2 倍反应缓冲液和 1 倍二硫苏糖醇(DTT)混合液,再加入 caspase-3 底物天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸氟甲基酮对硝基苯胺(DEVD-pNA),37 ℃水浴 1 h;然后用全自动酶标仪在波长 405 nm 处读取 A 值。

1.2.8 统计学处理:实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 软件进行 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硒蛋白多糖抑制 K562 细胞增殖(表 1);10% 硒蛋白多糖含药血清对 K562 细胞生长有抑制作用,这种作用呈时间-剂量依赖性。

2.2 荧光显微镜观察结果(表 2);K562 细胞经 10% 硒蛋白多糖含药血清处理 48 h 后,AO/EB 染色,荧光显微镜下观察可见细胞表现出凋亡的特征性形态变化,如细胞体积缩小,细胞核固缩,膜起泡,核断裂及形成凋亡小体等。细胞计数显示其凋亡率呈时间-剂量依赖性。

表 2 硒蛋白多糖含药血清对 K562 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of selenium-protein polysaccharide herb-contained serum on apoptotic rate of K562 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

10%的 含药血清	凋亡率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
空白	2.00±0.41	3.25±0.96	3.75±1.32
0.05 g/kg	4.00±0.82*	11.75±3.40*	17.63±2.50 [△]
0.10 g/kg	6.88±1.93 [△]	15.75±3.97 [△]	24.38±2.72 [△]

注:与空白比较;*P<0.05,[△]P<0.01

2.3 DNA 电泳(图 2):硒蛋白多糖含药血清处理 K562 细胞 72 h 后,DNA 琼脂糖凝胶电泳显示梯状

降解条带。



M 为 Marker;A 为空白无药血清处理对照组; B 为小剂量硒蛋白多糖含药血清处理实验组; C 为大剂量硒蛋白多糖含药血清处理实验组
图 2 硒蛋白多糖含药血清处理 K562 细胞 72 h 后琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 DNA agarose gel electrophoresis of K562 cells treated by selenium-protein polysaccharide herbal contain-serum for 72 hours

2.4 caspase-3 活性检测(表 3):硒蛋白多糖含药血清作用 12 h 后,caspase-3 活性即增强,24~48 h 后活性增强更为明显。caspase-3 活性随制备含药血清中的硒蛋白多糖浓度递增而增强,呈浓度依赖性(P<0.01),表明硒蛋白多糖含药血清可以激活 caspase-3 活性。

表 3 硒蛋白多糖含药血清对 K562 细胞 caspase-3 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effects of selenium-protein polysaccharide herb-contained serum on activity of caspase-3 in K562 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

10%的 含药血清	caspase-3 活性(A 值)		
	12 h	24 h	48 h
空白	0.151±0.013	0.191±0.017	0.215±0.022 [△]
0.05 g/kg	0.183±0.014*	0.314±0.015 [△]	0.303±0.021 [△]
0.10 g/kg	0.210±0.012 [△]	0.436±0.013 [△]	0.312±0.013 [△]

注:与空白比较;*P<0.05,[△]P<0.01

3 讨论

体外培养尽管具有简捷、实验条件易于控制以

及结果易于检测等优点,但其最主要的缺陷是所培养的对象脱离了有机体对机体细胞的整体支配和调控,不能完全代表体内的真实环境。20 世纪 80 年代中期,日本学者 Iwama 等^[15]提出的血清药理学方法实现了体外与体内实验的结合,其实验结果与体内实验有较好的一致性。目前决大多数研究中使用的含药血清均来自于正常动物血清,尽管多数文献报道具有良好的实验结果,然而其实验结果是否能代表体内的真实环境,值得质疑。本研究中,我们通过制备荷瘤小鼠模型制备含药血清,以使其尽可能地代表体内真实环境。结果发现,10%的硒蛋白多糖含药血清作用于 K562 细胞不同时间后,对 K562 细胞生长有抑制作用,这种抑制作用呈时间-剂量依赖性。形态学观察也可见肿瘤细胞核固缩,膜起泡,核断裂及形成凋亡小体,表现为典型的凋亡特征;硒蛋白多糖处理 K562 细胞 72 h 后, DNA 琼脂糖凝胶电泳显示梯状降解条带,进一步证实了硒蛋白多糖含药血清可诱导白血病细胞株 K562 细胞凋亡。

为了进一步探测可能的促凋亡分子机制,我们选择了与肿瘤凋亡密切相关的 caspase-3 基因。研究表明, caspase 家族在血液肿瘤的发生、治疗及转归中扮演着极其重要的角色^[16]。caspase 是一个含有半胱氨酸活性的胞浆蛋白酶家族,与线虫细胞 ced3 基因高度同源,目前至少发现 13 种,各种凋亡诱导因素最后都通过 caspase 蛋白系统起作用,其中 caspase-3 蛋白的表达是各种细胞凋亡途径的最后关键步骤^[17,18]。在许多凋亡过程中, caspase-3 被凋亡信号激活后由其前体形式转变为成熟的酶,进而酶解切割特异性底物如 ADP 核糖聚合酶、DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)、固醇调控元件结合蛋白(SREBP)、肌动蛋白、胞影蛋白、核纤层蛋白等,通过其结构改变或影响特定的信号分子而参与细胞凋亡的发生^[19,20]。本研究结果显示硒蛋白多糖含药血清可显著增强 caspase-3 活性,推测硒蛋白多糖含药血清可能通过上调 caspase-3 活性而使 K562 细胞发生凋亡。

参考文献:

[1] 近藤贤,著,刘雪卿,译.巴西蘑菇与癌症[M].台湾正义出版社,1998:1-8.
 [2] Ohno N, Furukawa M, Miura N N, et al. Antitumor beta glucan 9 from the cultured fruit body of *Agaricus blazei* [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 820-828.
 [3] Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* murill and its Mechanism of action [J]. J Nutr, 2001, 131: 1409-1413.

[4] Mizuno M, Minato K, Ito H, et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill [J]. Biochem Mol Biol Int, 1999, 47: 707-714.
 [5] Ebina T, Fujimiya Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice [J]. Biotherapy, 1998, 11: 259-265.
 [6] Ito H, Shimura K, Itoh H, et al. Antitumor effects of a new polysaccharide protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (iwade strain 101) "himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice [J]. Anticancer Res, 1997, 17: 277-284.
 [7] Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, et al. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* murill fractions in vitro [J]. Cell Struct Funct, 2001, 26: 103-108.
 [8] Mizuno M, Morimoto M, Minato K, et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T cell subsets in mice [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62: 434-437.
 [9] Delmanto R D, de Lima P L, Sugui M M, et al. antimutagenic effect of *Agaricus blazei* murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide [J]. Mutat Res, 2001, 496: 15-21.
 [10] Luiz R C, Jordao B Q, da Eira A F, et al. Mechanism of anti-clastogenicity of *Agaricus blazei* murill mushroom organic extracts in wild type CHO (K1) and repair deficient (xrs5) cells by chromosome aberration and sister chromatid exchange assays [J]. Mutat Res, 2003, 528: 75-79.
 [11] Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, et al. Inhibition by *Agaricus blazei* murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 1645-1647.
 [12] Osaki Y, Kato T, Yamamoto K, et al. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei* [J]. Yakugaku Zasshi, 1994, 114: 342-350.
 [13] Pung A. Some differentiation effect of the cultured human hepatoma cells and human pulmonary adenocarcinoma cells in vitro [J]. Biological Trace Element Research, 1987, 14: 19.
 [14] Djebaili M, De Bock F, Baille V, et al. Implication of P53 and caspase-3 in kainic acid but not N-methyl-D-aspartic acid-induced apoptosis in organotypic hippocampal mouse cultures [J]. Neurosci Lett, 2002, 327: 1-4.
 [15] Iwama H, Amagaya S, Ogiwara Y, et al. Effect of Shosai-koto, a Japanese and Chinese herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of Lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method [J]. Ethnopharmacol, 1987, 21: 45-53.
 [16] 尹卫东, 许白男. 半胱氨酸无冬酶家族和创伤性脑损伤 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 502-503.
 [17] Salvesen G S, Dixit V M. Caspase activation: the induced proximity model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10964-10967.
 [18] Namura S, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 1998, 18: 3659-3668.
 [19] Nagata S. Apoptosis by death factor [J]. Cell, 1997, 88: 355-365.
 [20] Faser A, Evan G. A license to kill [J]. Cell, 1996, 85: 781-784.
 (收稿日期: 2005-11-22 修回日期: 2006-04-10)
 (本文编辑: 李银平)