

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.011

灵芝多糖对单核巨噬白血病细胞株的体外作用*

李 宁¹ 赵树立² 徐贞俊² 翁磊华² 侯亚义^{2△}

(1 济南大学医学与生命科学学院 山东 济南 250022;

2 南京大学医学院 & 南京大学国家生物医药技术重点实验室 江苏 南京 210093)

摘要 目的:研究灵芝多糖对单核巨噬白血病细胞 THP-1 和 RAW264.7 的肿瘤生物学活性的影响。**方法:**用 1、50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的灵芝多糖和脂多糖(LPS)刺激 THP-1 和 RAW264.7 细胞, CCK-8 法测定巨噬细胞的增殖活力、流式细胞仪检测细胞的凋亡活性、Q-PCR 检测细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12 基因、相关凋亡信号通路基因 TRADD、TNFSF10、TNFRSF10b、NF κ BI、Caspase 10 和 Caspase 3 基因的 mRNA 表达水平。**结果:**灵芝多糖可以呈反浓度依赖性地刺激两种细胞的增殖, 在 50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下可引起细胞凋亡, 凋亡信号基因 TNFRSF10b 和 NF κ BI 的 mRNA 水平在 24h 升高了 53% 和 48%; 在 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度下可上调细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12 细胞因子 mRNA 的表达水平。**结论:**灵芝多糖对白血病细胞株具有双重作用, 在低浓度下促进细胞增殖, 而在高剂量时诱导细胞凋亡, 均可上调免疫相关细胞因子的表达。

关键词:灵芝多糖; 单核巨噬白血病细胞; 死亡受体信号通路; 细胞因子

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)27-5238-04

The Dual Effects of Ganoderma Lucidum Polysaccharides on Monocyte-Macrophage Leukemia Cell Lines In Vitro*

Li Ning¹, ZHAO Shu-li², XU Zhen-jun², WENG Lei-hua², HOU Ya-yi^{2△}

(1 School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Jinan, Shandong, 250022, China;

2 State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Shandong, 210093, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of Ganoderma lucidum polysaccharides (GLP) on tumor biology of the monocyte-macrophage THP-1 and RAW264.7. **Methods:** After THP-1 and Raw264.7 cells were stimulated with different concentrations of GLP and LPS, the proliferation and apoptosis activity of cells were analyzed by CCK-8 kits and flow cytometry. RT-PCR was used to detect expression of cytokines of macrophages, such as TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-12, and Q-PCR was used to detect the gene expression levels in apoptosis signaling pathway. **Results:** GLP could promote proliferation of THP-1 and RAW264.7 cells in an inverse dose-dependent, and up-regulate expression of cytokines secretion at all concentrations. And also GLP could elevate expression of apoptosis related genes TNFRSF10b and NF κ BI. **Conclusion:** GLP played a dual role on leukemia cell line, that is it increased expression of cytokines and promoted cells proliferation at lower concentration, while at high doses caused cells apoptosis.

Key words: Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP); Monocyte-macrophage leukemia cell; Death receptor signaling pathway; Cytokines

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5238-04

前言

灵芝(Ganoderma)为担子菌纲、多孔菌科、灵芝属真菌。多糖是灵芝水提物中的主要活性成分之一。现代医学实验证明, 灵芝多糖活性广泛, 具有提高机体免疫功能^[1]、抗肿瘤^[2]、消除体内自由基、抗辐射、提高肝脏解毒功能等作用^[3,4]。有研究报道, 灵芝多糖能够诱导肿瘤细胞死亡, 并且产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白介素 1(IL-1), 但具体机制不明^[5,6]。目前研究表明, 灵芝多糖能刺激人树突状细胞(DC)的成熟, 具有正常单核细胞的免疫调节作用^[7,8], 但对具有免疫活性的单核巨噬白血

病细胞的肿瘤生物学活性的影响还没有相关报道, 本研究用白血病细胞株 THP-1 和 RAW264.7 细胞来探讨灵芝多糖对白血病的影响机制, 为灵芝多糖在白血病上的临床运用提供参考。

1 材料和方法

1.1 灵芝多糖

赤芝菌株, 27 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇动发酵培养 8 d, 发酵液过滤除菌, 提取多糖。由南京中科药业有限公司馈赠。溶于 RPMI1640 培养基, 过滤除菌后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。使用前用 RPMI1640 培养基稀释成不同浓度。

* 基金项目: 济南大学博士基金(XBS1346)

作者简介: 李宁(1981-), 女, 博士, 讲师, 主要从事基因工程药物研究, 电话: 0531-83126950, E-mail: mls_lin@ujn.edu.cn

△通讯作者: 侯亚义, E-mail: yayihou@nju.edu.cn

(收稿日期: 2013-11-17 接受日期: 2013-12-15)

1.2 细胞培养

本实验室冻存的 THP-1 和 Raw264.7 细胞株,接种于含青霉素(80 万 U/ml)、链霉素(100 mg/ml)、10%胎牛血清(四季青公司)的 RPMI1640 培养基(Gibco)中,37℃,5%的 CO₂ 培养箱中培养,取对数生长的细胞用于实验。

1.3 细胞增殖活性检测

采用 CCK8 试剂盒^[9]进行细胞增殖活性检测。细胞以 2000 个/孔接种于 96 孔板内,同时加入一定浓度的灵芝多糖(终浓度分别为 1、50 和 100 μg/ml),并设脂多糖(LPS)对照组(1 μg/ml)和 RPMI1640 培养液对照组,另外设不加细胞的空白对照组,每组设 5 个复孔。CO₂ 培养箱中分别培养 24 h 和 48 h,培养结束前 4 h 加入 10 μL 的 CCK8 溶液,继续培养 1 h,酶标仪测 450 nm 处吸光度(OD)值。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

在进行完细胞凋亡刺激后,离心收集细胞,用 PBS 重悬后计数。取 5-10 万个细胞,加入 195 μL 的 Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL 的 Annexin V-FITC,混匀,室温避光孵育 10 min 后,离心,用 190 μL 结合液重悬细胞后加入 10

μL 的 PI,混匀,冰浴避光放置,随即进行流式细胞仪检测^[10]。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

用细胞周期检测试剂盒(凯基生物公司)进行细胞周期检测。取适量处理后的细胞,用 PBS 洗涤一次后收集细胞调整浓度为 1×10^6 /ml,制备单细胞悬液,并用体积分数为 70%乙醇固定,4℃保存,染色前用 PBS 洗去固定液;加入 100 μL 的 RNase A,37℃水浴 30 min;加入 400 μL 的 PI 染色混匀,4℃避光 30 min 后进行流式细胞仪检测并分析细胞周期。

1.6 Q-PCR 检测细胞因子和凋亡信号通路相关分子

收集相关细胞样本,按照 QIAGEN 公司细胞 RNA 提取试剂盒的说明书进行操作,通过全自动紫外分光光度仪检测所得 RNA 的质量和浓度。采用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒,将 RNA 反转录为 cDNA。采用 SYBR Green I 荧光染料染色后应用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行定量检测,进行相关细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12,和细胞凋亡通路相关基因 TRADD、TNFSF10、TNFRSR10b、NFκB、Casp 10 和 Casp 3 的表达相对定量(引物序列如表 1 所示)。

表 1 引物列表

Table 1 The primer sequences

Primer	Foward sequence	Reverse sequence
IL-6	TTTCGCAAATGTAGCATG	AATAGTGTCTTAACGCTCATAC
TNF-α	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IL-12	AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA	AAAGCCAACCAAGCAGAAGA
IL-1	AATGACGCCCTCAATCAAAG	TGGGTATCTCAGGCATCTCC
NFKB1	CTCAAAGCAGCAGGAGCAGATC	TCCCAAGAGTCATCCAGGTCATAG
Casp 3	ATGGACCACGCAGGAAGGG	GGCAGCATCATCCACACATACC
Casp 10	GAAAAGCAAACCTCGGGGATAC	CCAAGTGTGTTCCATTCTGTC
TNFRSR10b	GCACCACGACCAGAAACACAG	CAATCACCGACCTTGACCATCC
TNFSF10	GCTGAAGCAGATGCAGGACAAG	CTGACGGAGTTGCCACTTGAC
TRADD	TTTGCTGGCGGACGAGGAG	CCGAGCCGCACTTCAGATTTC
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC

1.7 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异水准;流式标本采用 CellQuest 分析。

2 结果

2.1 灵芝多糖促进 THP-1 和 RAW264.7 细胞增殖

实验组 THP-1 和 RAW264.7 细胞在不同浓度的灵芝多糖刺激 24 h 后,OD 值明显高于对照组($P < 0.05$,见图 1),可见灵芝多糖对白血病细胞株有刺激细胞增殖的作用,与 LPS 作用相似,但在试验浓度范围内未表现出明显浓度依赖关系,且高浓度的灵芝多糖(50 和 100 μg/ml)比低浓度(1 μg/ml)的促进效应低。

2.2 高浓度灵芝多糖促进 THP-1 和 RAW264.7 细胞凋亡

经流式细胞仪检测表明,三个不同实验浓度的灵芝多糖刺激 THP-1 和 RAW264.7 细胞后,在 1 μg/ml 下对细胞周期没有影响,但在 50 μg/ml 和 100 μg/ml 作用 24h 明显引起这两种细胞的凋亡(图 2)。

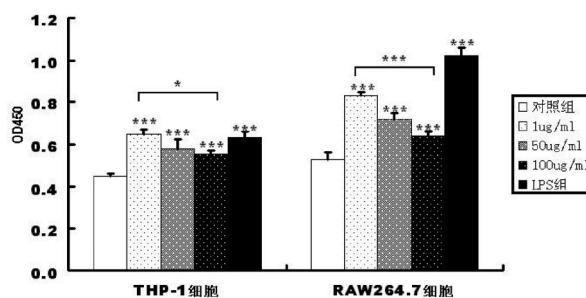


图 1 不同浓度灵芝多糖对 THP-1 和 RAW264.7 细胞增殖活性的影响

Fig. 1 Stimulating effects of different GLP on THP-1 cells

2.3 灵芝多糖上调相关细胞因子的表达

由于确定了灵芝多糖在相同的浓度下对两种细胞的增殖和凋亡趋势相同,所以用 1、50 和 100 μg/ml 的灵芝多糖只刺激 THP-1 细胞来观察基因水平的变化差异。图 3 表明,在 24 h 后,不同浓度的灵芝多糖均可以上调细胞因子 TNF-α、IL-1、IL-6 和 IL-12 的 mRNA 的转录水平,其中 1 μg/ml 的刺激效应最低,50 和 100 μg/ml 之间没有差别,表明在一定的浓度范围

内具有明显的浓度依赖性(图3)。

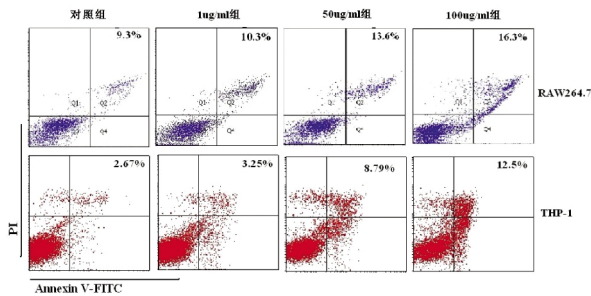


图2 高浓度灵芝多糖能引起 RAW264.7 和 THP-1 细胞的凋亡

Fig. 2 GLP at higher concentrations could induce apoptosis of RAW264.7 and THP-1 cells

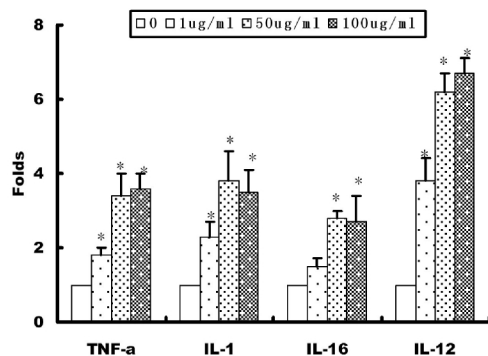


图3 灵芝多糖可浓度依赖性上调多种细胞因子的表达

Fig. 3 GLP could up-regulate expression of some cytokines of THP-1 cells in a concentration-dependent manner

2.4 灵芝多糖对细胞凋亡通路基因分子影响

由于 100 $\mu\text{g/ml}$ 灵芝多糖的细胞增殖效应下降,并且引起了细胞的凋亡,进一步在 100 $\mu\text{g/ml}$ 灵芝多糖刺激 THP-1 细胞 6 h、24 h 后,分析了细胞凋亡通路相关基因 TRADD、TNFSF10、TNFRSF10b、NF κ BI、Casp 10 和 Casp 3 的表达差异情况。结果表明,DR3、DR4/5 死亡受体信号通路上的 TNFRSF10b 和 NF κ BI 基因上调比较明显(图4)。所以,我们推测灵芝多糖可能是通过 DR3、DR4/5 死亡受体信号通路引起细胞凋亡,并激活 NF-KB 信号通路增加细胞因子分泌。

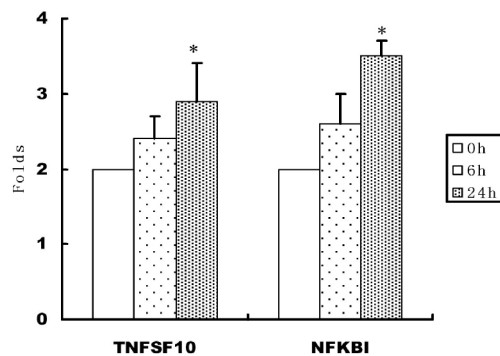


图4 灵芝多糖刺激对 THP-1 细胞后凋亡相关基因的影响

Fig. 4 GLP could activate apoptosis related genes

3 讨论

免疫调节是目前公认的灵芝多糖抗肿瘤作用的主要机制

之一。与大多数药品不同的是,多糖作为一种免疫增强剂,不但能激活 T 细胞^[11]、DC 细胞、巨噬细胞、NK 细胞^[12]、CTL 细胞^[13]、LAK 细胞等免疫细胞的活性,还能促进 IL-1、IL-2、TNF- α 、INF- γ 、NO 等生成^[14,15],达到调节机体抗体和补体的形成,起到提高机体抗肿瘤免疫力的作用^[16],其中对细胞因子的研究是免疫学、肿瘤学专家共同关注的热点和前沿问题之一,这些细胞因子的产生和相互作用对机体抗御疾病和维持生理恒定有重要意义。白血病是造血系统的恶性肿瘤,以造血细胞分化成熟受阻、未分化细胞大量增殖为其特征。多数研究报道认为灵芝多糖在体外没有直接的抑制或杀伤肿瘤细胞的作用^[17,18],灵芝多糖的抗肿瘤作用是通过增强免疫功能而介导的。本研究对灵芝多糖对具有免疫细胞活性的单核巨噬白血病细胞的生物学活性进行了相关报道,为灵芝多糖在白血病的临床运用进行了初步探索。本研究结果显示,1 $\mu\text{g/ml}$ 灵芝多糖对小鼠白血病 RAW264.7 细胞和人白血病 THP-1 细胞均具有刺激细胞增殖的作用和细胞因子的分泌,表现出免疫激活效应;而随着浓度的增加(50 和 100 $\mu\text{g/ml}$)这种免疫激活作用呈现减弱趋势,进一步的研究结果表明,这一现象与高浓度下引起这两种细胞的凋亡有关。另外,灵芝多糖可以刺激 THP-1 和 RAW264.7 细胞免疫相关细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-12 的 mRNA 的表达,提示其可以对单核巨噬细胞的免疫调节功能产生影响。通过对细胞凋亡通路相关基因分子 mRNA 的研究发现,灵芝多糖处理可激活 DR3、DR4/5 死亡受体信号通路上的 TNFRSF10b 和 NF κ BI 基因上调,因此推测其对引起细胞凋亡可能与死亡受体信号通路有关,同时该通路上 NF-KB 的激活也引起了免疫相关细胞因子的上调,这与试验中的发现是吻合的,上述研究结果为进一步研究灵芝多糖的抗肿瘤机制提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] Zhang S, Nie S, Huang D, et al. Immunomodulatory effect of Ganoderma atrum polysaccharide on CT26 tumor-bearing mice [J]. Food Chem, 2013, 136(3-4): 1213-1219
- [2] Yan B, He ZH, Qin ZF. Ganoderma spore induced increased CA72-4 in three gastroenteric tumor patients and literature analysis [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medical, 2012, 32(10): 1426-1427
- [3] Xiao C, Wu QP, Cai W, et al. Hypoglycemic effects of Ganoderma lucidum polysaccharides in type 2 diabetic mice [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(10): 1793-1801
- [4] Wang J, Wang Y, Liu X, et al. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of Ganoderma lucidum polysaccharides derivatives [J]. Carbohydr Polym, 2013, 91(1): 33-38
- [5] Zhang J, Tang Q, Zhou C, et al. GLIS, a bioactive proteoglycan fraction from Ganoderma lucidum, displays anti-tumour activity by increasing both humoral and cellular immune response [J]. Life Sci, 2010, 87(19-22): 628-637
- [6] Cheng KC, Huang HC, Chen JH, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides in human monocytic leukemia cells: from gene expression to network construction [J]. BMC Genomics, 2007, 8(1): 411
- [7] Meng J, Hu X, Shan F, et al. Analysis of maturation of murine

- dendritic cells (DCs) induced by purified Ganoderma lucidum polysaccharides (GLPs) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49 (4): 693-699
- [8] Lin YL, Liang YC, Tseng YS, et al. An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and MAPK pathways[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(4): 877-889
- [9] Zheng YX, Yang M, Rong TT, et al. CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(18): 2253-2261
- [10] Han H, Peng J, Gobert GN, et al. Apoptosis phenomenon in the schistosomulum and adult worm life cycle stages of *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasitol Int*, 2012, 13 (12): 136
- [11] Zhang Y, Lin Z, Hu Y, et al. Effect of Ganoderma lucidum capsules on T lymphocyte subsets in football players on "living high-training low"[J]. *Br J Sports Med*, 2008, 42(10): 819-22
- [12] Chien CM, Cheng JL, Chang WT, et al. Polysaccharides of Ganoderma lucidum alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(21): 5603-5609
- [13] Cao LZ, Lin ZB. Regulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(4): 321-326
- [14] Xue H, Qiao J, Meng G, et al. Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on hemodynamic and antioxidation in T2DM rats[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(3): 339-343
- [15] Li WJ, Nie SP, Chen Y, et al. Ganoderma atrum polysaccharide protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation-induced oxidative stress by mitochondrial pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(1): 191-200
- [16] Sudheesh NP, Ajith TA, Ramnath V, et al. Therapeutic potential of Ganoderma lucidum (Fr.) P. Karst. against the declined antioxidant status in the mitochondria of post-mitotic tissues of aged mice[J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(3): 406-412
- [17] Wang JH, Zhou YJ, Zhang M, et al. Active lipids of Ganoderma lucidum spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139 (2): 582-589
- [18] Calviño E, Manjón JL, Sancho P, et al. Ganoderma lucidum induced apoptosis in NB4 human leukemia cells: involvement of Akt and Erk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 71-78

(上接第 5237 页)

参考文献(References)

- [1] Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 276-287
- [2] Arpin M, Chirivino D, Naba A, et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration [J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5 (2): 199-206
- [3] Zhou B, Leng J, Hu M, et al. Ezrin is a key molecule in the metastasis of MOLT4 cells induced by CCL25/CCR9 [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(6): 769-776
- [4] Meng Y, Lu Z, Yu S, et al. Ezrin promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2010, 27(8): 61-67
- [5] Kang YK, Hong SW, Lee H, et al. Prognostic implications of ezrin expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(9): 798-804
- [6] Xu-dong S, Zan S, Shui-er Z, et al. Expression of Ezrin correlates with lung metastasis in Chinese patients with osteosarcoma [J]. *Clin Invest Med*, 2009, 32(2): 180-188
- [7] 姜永梅, 陈爱平. Ezrin 蛋白和 CD44 在卵巢癌中的表达及意义[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2010, 10: 344-346
- Jiang Yong-mei, Chen Ai-ping. Expression of Ezrin and CD44 in Ovarian Cancer and Its Implication [J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*, 2010, 10:344-346
- [8] Hannah V, Carey Matthew T, Rews, et al. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83: 1152-1181
- [9] Tan J, Zhang C, Qian J. Expression and significance of Six1 and Ezrin in cervical cancer tissue [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6): 1241-1247
- [10] Abdou AG, Maraee AH, El-Sayed EM, et al. Immunohistochemical expression of Ezrin in cutaneous basal and squamous cell carcinomas [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2011, 15(6): 394-401
- [11] Wang WH, Yeh CN, Cheng YF, et al. Phosphorylated T567 Ezrin is associated with merlin expression in KIT-mutant gastrointestinal stromal tumors [J]. *Mol Med Report*, 2012, 5(1): 17-21
- [12] Wei YC, Li CF, Yu SC, et al. Ezrin overexpression in gastrointestinal stromal tumors: an independent adverse prognosticator as associated with the non-gastric location[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(10): 1351-1360
- [13] 周龙, 袁先厚, 文志华. Ezrin 蛋白与 E 钙黏素在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2010, 31(5): 676-679
- Zhou Long, Yuan Xian-hou, Wen Zhi-hua. Expression of Ezrin and E-Cadherin in Human Gliomas and Their Significance [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2010, 31(5): 676-679
- [14] 陆晓曼, 彭春. Ezrin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *陕西医学杂志*, 2010, 39: 91-93
- Lu Xiao-man, Peng Chun. Expression of Ezrin in non-small cell lung cancer and its clinical significance [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2010, 39: 91-93
- [15] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300
- [16] Monni R, Haddaoui L, Naba A, et al. Ezrin is a target for oncogenic Kit mutants in murine erythroleukemia [J]. *Blood*, 2008, 111 (6): 3163-3172
- [17] Kim C, Shin E, Hong S, et al. Clinical value of ezrin expression in primary osteosarcoma [J]. *Cancer Res Treat*, 2009, 41(3): 138-144
- [18] Ren L, Hong SH, Cassavaugh J, et al. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC [J]. *Oncogene*, 2009, 28: 792-802