

低分子量姬松茸多糖对胃癌 BGC823 细胞生长和侵袭的影响

陈琼霞¹, 梁彪², 李越², 彭勇胜³, 孔繁琪², 刘丽江¹, 胡筱波²

(1. 江汉大学医学院病理学教研室, 湖北武汉 430056) (2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

(3. 武汉产品质量监督检验所, 湖北武汉 430043)

摘要: 通过观察低分子量姬松茸多糖(LABP)对胃癌细胞系 BGC823 增殖、侵袭的影响及作用过程中相关分子蛋白水平表达的变化, 探讨其对 BGC823 细胞影响的机制。运用 WST-1 和 Transwell 实验检测 LABP 对胃癌 BGC823 细胞生长和侵袭的影响; 采用 Western blot 实验检测相关分子蛋白质水平表达的变化。与空白对照组相比, LABP 组细胞数量明显减少 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性, 当 LABP 浓度为 1×10^{-4} g/mL 时, 对 BGC823 细胞的抑制率分别为 33.4%、69.8%。LABP 组穿透过膜细胞较空白对照组明显减少, 细胞侵袭能力受到抑制; LABP 组中 Caspase 3 蛋白表达上升 ($P < 0.05$); MMP 9 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$), 而 E-cadherin 无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明低分子量姬松茸多糖 (LABP) 对胃癌 BGC823 细胞的生长和侵袭具有抑制作用。LABP 可能通过上调 Caspase 3 蛋白表达, 下调 MMP9 蛋白表达, 抑制胃癌 BGC823 细胞的生长。

关键词: 低分子量姬松茸多糖; BGC823 细胞; 生长; 侵袭

文章编号: 1673-9078(2014)7-6-9

Influence of the Low-molecule-weight Polysaccharides of *Agaricus blazei* Murrill on Proliferation and Invasion in Gastric Cancer BGC823 Cells

CHEN Qiong-xia¹, LIANG Biao², LI Yue², PENG Yong-sheng³, KONG Fan-qi², LIU Li-jiang¹, HU Xiao-bo²

(1. Department of pathology, Medical College of Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

(2. Institute of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(3. Wuhan Product Quality Supervision & Inspection Institute, Wuhan 430043, China)

Abstract: The effect of polysaccharides with low molecule weight from *Agaricus blazei* Murrill (LABP) on proliferation and invasion in gastric cancer cell line BGC823 was observed by WST-1 and Transwell assay, and the expression changes of some related molecules in protein level were determined by Western blot, to explore the mechanism of LABP affected on BGC823 cells. Compared with the control group, LABP group cells were significantly declined ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. BGC823 cell inhibition rates by LABP were 33.4% and 69.8%, respectively on LABP concentration of 1×10^{-4} g/mL. The cells permeated the membrane of LABP groups were obviously less and the protein expression of Caspase 3 of LABP group was dramatic increased ($P < 0.05$). The expression of MMP 9 was dramatic down-regulated ($P < 0.05$), while E-cadherin had no significant difference ($P > 0.05$). Thus, low-molecule polysaccharide of *Agaricus blazei* Murrill (LABP) had a dramatic inhibiting effect on growth and invasion in gastric cancer BGC823 cells. LABP inhibited the gastric cancer BGC823 cells growth, possibly by up-regulating the protein expression of Caspase 3 and down-regulating MMP9.

Key words: low molecule weight *Agaricus blazei* Murrill polysaccharide; BGC823 cell; growth; invasion

姬松茸 (*Agaricus blazei* Murrill, AbM) 又称巴西蘑菇、太阳菇、小松菇和柏氏蘑菇, 蘑菇属, 是一种原产于巴西、秘鲁和美国等的药食两用的珍稀菌种^[1]。

收稿日期: 2014-05-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资助 (2010JC008)

作者简介: 陈琼霞 (1967-), 女, 实验师, 研究方向: 临床病理诊断技术

通讯作者: 胡筱波 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物化

学

姬松茸味香浓郁, 口感极好, 颇有食用价值, 同时含有大量的蛋白质和多糖类物质, 营养价值很高。另外由于姬松茸含有丰富的多糖、核酸、活性肽和甾醇类生物活性物质, 具有提高机体免疫力、抗肿瘤、抗氧化、抗突变、抗病毒、抗辐射等功效^[2-6], 被广泛用于治疗如癌症、糖尿病、慢性肝炎等疾病。

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内发病率仅次于肺癌, 侵袭及转移作为胃癌患者的主要死

因之一, 已成现代医药学针对肿瘤治疗研究的热点。目前, 对姬松茸抗肿瘤活性研究主要集中在其增强免疫细胞活性, 促进细胞因子生成及释放, 调节机体免疫功能等方面, 表明姬松茸多糖对肿瘤的生长以及侵袭具有一定的抑制作用^[7-9], 但针对姬松茸对胃癌细胞生长及转移的研究较少, 因此通过 WST-1、Transwell 小室和 Western blot 等方法, 选择胃癌 BGC823 细胞为模型, 观察低分子量姬松茸多糖 (LABP, 10~100 kDa) 对胃癌 BGC823 细胞增殖和侵袭的影响, 检测凋亡和侵袭相关分子蛋白水平表达的变化, 探寻其在胃癌细胞 BGC823 生长中的作用及其机制, 以达到进一步了解姬松茸多糖对胃癌细胞生长的作用机制, 为姬松茸多糖在胃癌治疗中的应用提供理论依据和实验参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胃癌 BGC823 细胞, 购自中国科学院基础医学研究院细胞库, 置于含 10% 胎牛血清 (FBS), 100 U/mL 氨苄青霉素, 100 U/mL 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 浓度及饱和湿度恒温培养箱中培养。WST-1 细胞增殖检测试剂盒, 购自博士德生物技术公司; Transwell 细胞侵袭检测试剂盒, 购自 BD Falcon; 5-氟尿嘧啶 (5-FU), 购自 Sigma 公司; Caspase 3、MMP 9 和 E-cadherion, 购自 Santa Cruz 公司; β -actin, 购自博士德生物技术公司; HRP 辣根酶标记鼠/兔二抗, 购自 Thermo 公司。

1.2 仪器与设备

SW-OJ-2FD 超净工作台 AIRTECH; HF212UV CO₂ 培养箱 HEAL FORCE; Stat Fax2100 酶标仪 AWARENESS; Mikro120 离心机 Hettich; AUV220 电子天平 SHIMADZU; 85-2 恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; XDS-1B 倒置显微镜, 重庆光学厂; 3-18K 冷冻离心机, Sigma; LF-1 分子杂交仪, 宁波新芝生物技术公司; CHB-100 恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 WST-1 实验

取对数生长期的胃癌 BGC823 细胞传入 96 孔板中, 每孔细胞数量为 3×10^3 个。培养 24 h 后换液, 用 LABP (1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} g/mL), 5-氟

尿嘧啶 (5-FU, 1×10^{-7} g/mL) 及无菌水处理。处理 1 d 和 3 d 后停止加药处理, 除去孔内培养基, PBS 漂洗, 避光条件下每孔加入 100 μ L WST-1 与 DMEM(1:9) 混合液。置于培养箱内孵育 4 h 后, 以 450 nm 为测量波长、600 nm 为参考波长进行双波长测量。

抑制率 (%) = (空白对照组细胞数值 - 实验组细胞数值) / 空白对照组细胞数值 \times 100%

1.3.2 Transwell 小室实验

取对数生长期的胃癌 BGC823 细胞传入 6 孔板中, 每孔为 3×10^5 个, 培养 24 h 后换液、加药。处理 24 h 后终止加药处理, 胰酶消化后 1500 r/min 离心 5 min, 去除上清, 加入 Opti-Med 培养基制备无血清的细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^5 mL。向 24 孔板中加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 将 Transwell 小室置于上述孔中, 并加入 200 μ L 细胞悬液。培养 14 h 后取出小室, 除去小室内培养基, 刮除未侵袭的细胞, 加入染色液, 染色 20 min, PBS 漂洗, 自然风干, 拍照。

1.3.3 Western blot

取对数生长期的胃癌 BGC823 细胞传入 10 cm 培养皿中, 培养 24 h 后加药处理。处理 24 h 后结束后 PBS 漂洗, 刮取细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 弃去上清后, 加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 4 °C 15000 r/min 离心 15 min, BCA 法测量蛋白浓度, 加入 6 \times Loading Buffer, 100 °C 煮 5 min。以 30 μ g/孔蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离电泳 1 h, 以 450 mA 恒定电流湿式转膜 60 min。转膜完毕后, 加入 5% 牛奶封闭液, 37 °C 封闭 1 h。加入适量的一抗, 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜后再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔二抗, 37 °C 孵育 1 h, 再用 TBST 洗膜。加 ECL 显色液, 暗室曝光, 显影, 定影。用 Quality one 软件进行灰度分析。

1.3.4 统计学处理

本实验所有数据采取用 mean \pm SD 表示, 采用 t 检验进行差异性分析。

2 结果与讨论

2.1 LABP 对胃癌 BGC823 细胞生长的影响

如表 1 所示, 经 LABP 处理 24 h 和 72 h 后, LABP 组 OD 值与空白对照组相比, 明显降低 ($p < 0.05$), 且呈浓度依赖性。当 LABP 浓度为 1×10^{-4} g/mL 时对 BGC823 细胞的抑制率分别为 33.4%、69.8%。WST-1 结果表明低分子量姬松茸多糖 (LABP) 对胃癌 BGC823 细胞的生长具有较强的抑制作用, 在

10⁻⁷~10⁻⁴ g/mL 范围内, LABP 对胃癌 BGC823 细胞增殖的抑制作用呈剂量效应关系。

表 1 LABP 对胃癌 BGC823 细胞生长的影响

Table 1 Effect of LABP on growth in gastric cancer BGC823 cells

序号	组别	浓度/(g/mL)	24 h OD 值	24 h 抑制率/%	72 h OD 值	72 h 抑制率/%
1	空白对照组(C)		0.925±0.011		2.280±0.180	
2	阳性对照组(5-Fu)	1.00×10 ⁻⁷	0.709±0.007	23.40 ^b	1.080±0.047	52.60 ^b
3	LABP	1.00×10 ⁻⁷	0.864±0.014	6.60 ^a	1.540±0.079	32.50 ^b
4	LABP	1.00×10 ⁻⁶	0.777±0.010	16.00 ^b	1.340±0.071	41.40 ^b
5	LABP	1.00×10 ⁻⁵	0.705±0.004	23.80 ^b	1.150±0.042	49.70 ^b
6	LABP	1.00×10 ⁻⁴	0.616±0.010	33.40 ^b	0.689±0.020	69.80 ^b

注: 与正常对照组相比, ^aP<0.05, ^bP<0.01。

2.2 LABP 对胃癌 BGC823 细胞侵袭的影响

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特征之一, 与肿瘤预后直接相关, 是胃癌治疗失败的主要原因之一。细胞外基质含有丰富的胶原、糖蛋白和粘蛋白等多种成分, 是肿瘤细胞发生侵袭转移时的第一道生理屏障。在侵袭过程中, 肿瘤细胞与基底膜或细胞外基质粘附, 释放和激活多种蛋白水解酶(如基质金属蛋白水解酶)降解基底膜和细胞外基质, 从而导致肿瘤细胞的侵袭。Matrigel 滤膜的主要成分层粘连素是细胞外基质的主要成分, 用 Matrigel 观察细胞的侵袭力能有效地在体外模拟肿瘤细胞侵袭过程。本实验采用铺有 Matrigel 膜的 transwell 小室观察 LABP 对胃癌 BGC83 细胞侵袭能力的影响。穿过 Matrigel 膜的细胞数将越多, 说明胃癌 BGC83 细胞的侵袭能力越强。

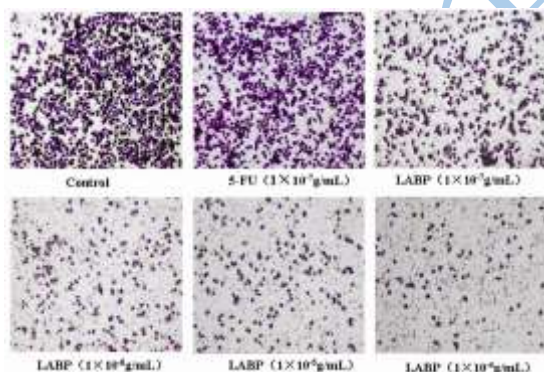


图 1 LABP 对胃癌 BGC823 细胞侵袭能力的影响

Fig 1 Effect of LABP on invasion in gastric cancer BGC823 cells

如图 1 所示, LABP 处理 24h 后, LABP 组穿透过膜的细胞数量与对照组相比明显减少, 且呈浓度依赖趋势, 证明低分子量姬松茸多糖(LABP)可以抑制胃癌 BGC823 细胞的侵袭。

2.3 LABP 对胃癌 BGC823 细胞内 Caspase 3、

MMP 9、E-cadherion 蛋白表达的影响

姬松茸多糖可以通过激活细胞凋亡通路, 促进细胞凋亡^[10]。细胞凋亡(apoptosis)是通过激活细胞固有自杀机制而引发的细胞自杀过程。细胞凋亡是在凋亡信号刺激后发生的主要由半胱氨酸蛋白酶 Caspases 介导的级联激活反应。Caspase 3 又称执行性 Caspase, 是 Caspase 的下游分子, 依赖上游 Caspase 分子的活化, 可以作用于底物蛋白, 使细胞解体, 诱导细胞凋亡^[11]。Western blot 显示, LABP 可以上调 Caspase 3 蛋白水平的表达, 表明其可能通过激活 Caspase 3 或增加其活性, 诱导细胞凋亡。Yu 等 2009 也报道了姬松茸可以抑制前列腺癌 PC3 细胞生长, 增强 Caspase 3 的活性, 口服姬松茸发酵液可显著抑制荷瘤小鼠体内肿瘤生长^[12]。

如图 2 所示, 经低分子量姬松茸多糖 LABP (1×10⁻⁷、1×10⁻⁶、1×10⁻⁵、1×10⁻⁴ g/mL) 处理 24 h 后, LABP 组与空白对照组相比, 其 Caspase 3 蛋白表达明显增高(P<0.05); MMP 9 蛋白表达明显降低(P<0.01); E-cadherion 蛋白表达无显著性差异(P<0.01), 表明 LABP 可以促进胃癌 BGC823 细胞中 Caspase 3 蛋白的表达, 抑制 MMP 9 的表达, 但对 E-cadherion 蛋白表达无明显影响。

3 结论

3.1 姬松茸具有提高机体免疫力、抑制肿瘤生长和转移的特性, 目前已被广泛用于癌症的防治^[13]。其主要的多糖生物活性物质β-葡聚糖已被证实可以通过细胞毒性而抑制癌症发展^[14]。

3.2 综上所述, 我们检测了低分子量姬松茸多糖(LABP)对胃癌 BGC823 生长和侵袭的影响, 发现 LABP 对 BGC823 细胞生长和侵袭具有较强的抑制作用且呈剂量效应关系。通过蛋白免疫印迹研究, 我们

发现 LABP 可上调 Caspase 3 蛋白表达, 下调 MMP 9 蛋白表达, 从而揭示了 LABP 可能通过促进细胞凋亡、抑制细胞侵袭, 从而抑制胃癌 BGC823 细胞生长作用。

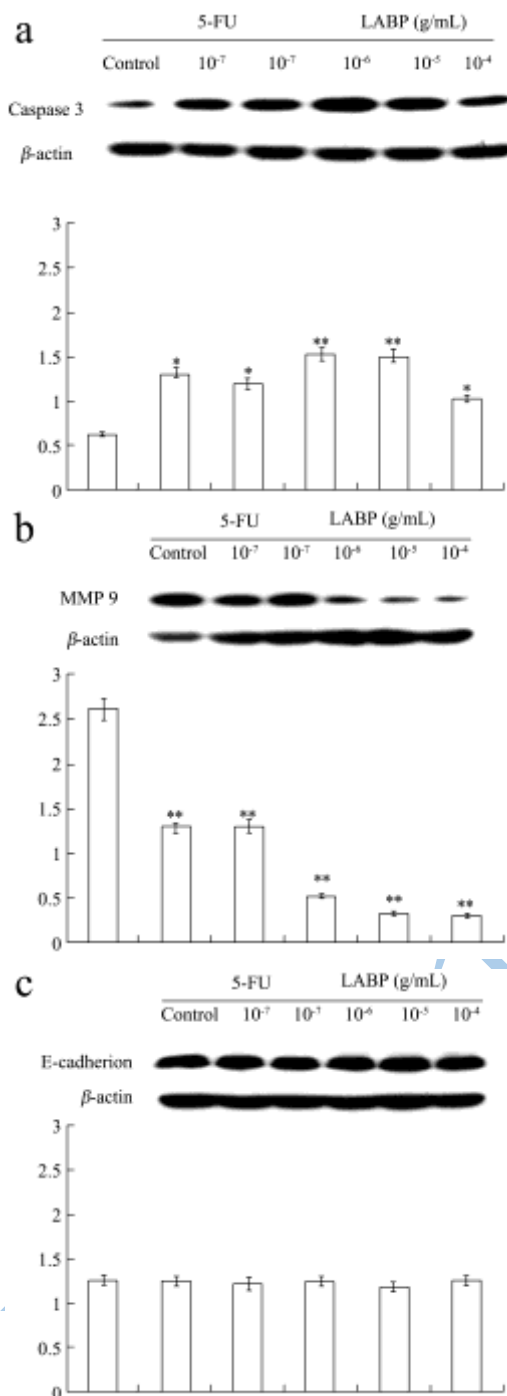


图2 LABP 对胃癌 BGC823 细胞内 Caspase 3 (a), MMP 9 (b), E-cadherin (c) 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of LABP on protein expressions of Caspase 3(a), MMP 9(b), E-cadherin(c) in BGC823 cells

参考文献

[1] Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom

Agaricus blazei murrill: review of literature and pharmacotoxicological problems [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2008,5(1): 3-15

[2] Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies [J]. Carbohydrate Research, 1989, 2(186): 267-213

[3] Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, et al. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2005, 8(131): 527-538

[4] Kawamura M, Kasai H. Delayed cell cycle progression and apoptosis induced by hemicellulase-treated *Agaricus blazei* [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2007, 4(1): 83-94

[5] Ishii PL, Prado CK, Mauro MO, et al. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011, 3(59): 412-422

[6] Zhou Linbin, Chen Bin. Bioactivities of water-soluble polysaccharides from Jisongrong mushroom: anti-breast carcinoma cell and antioxidant potential [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(1): 1-4

[7] 牛英才,赵雪梅,刘吉成.低分子量姬松茸多糖对小鼠 S80 肉瘤的抑制作用及其机制[J].肿瘤防治研究, 2009, 36(3): 180-182

NIU Ying-cai, ZHAO Xue-mei, LIU Ji-cheng. Low molecular weight polysaccharide *Agaricus S80* sarcoma in mice and its mechanism of inhibition [J]. Journal of Cancer Research, 2009, 36(3): 180-182

[8] Liu Jicheng, Yue Liling, Zhang Chun, et al. A polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* Murill inhibits sialyl Lewis X/E-selectin-mediated metastatic potential in HT-29 cells through down-regulating α -1, 3-fucosyltransferase-VII (FucT-VII) [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 4(79): 921-926

[9] 牟华.姬松茸多糖对 HT-29 细胞与内皮细胞侵袭、粘附的影响和作用[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 216-218

MOU Hua. The influence about the *Agaricus* polysaccharides invade and adhere on HT-29 cells and endothelial cells [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(9):216-218

[10] Jin C Y, Choi Y H, Moon D O. Induction of G₂M arrest and

- apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei* [J]. *Oncol. Rep.*, 2006, 16: 1349-1355
- [11] in CY, Choi Y H, Moon D O. Induction of G₂M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei* [J]. *Oncol. Rep.*, 2006, 16: 1349-1355
- [12] Kim CF, Jiang JJ, Leung KN, et al. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(2): 320-326
- [13] Kim CF, Jiang JJ, Leung KN, et al. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 122(2): 320-326
- [14] Kim YW, Kim KH, Choi HJ, et al. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei* [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 7(27): 483-487

现代食品科技