

羊肚菌多糖对人结肠癌细胞SW620体外增殖的抑制作用

刘晓飞, 陈丽莉, 金忠琨, 段怡然, 李翼, 李明堂*

长春理工大学生命科技学院, 吉林 长春

Email: 2580050412@qq.com, *1991800031@cust.edu.cn

收稿日期: 2021年6月7日; 录用日期: 2021年7月28日; 发布日期: 2021年8月4日

摘要

目的: 研究羊肚菌多糖对人结肠癌细胞SW620体外增殖的抑制作用。方法: 采用mtt法、划线法和集落生成分析法检测羊肚菌多糖对人结肠癌细胞SW620的体外增殖抑制作用, 采用流式细胞技术检测羊肚菌多糖对人结肠癌细胞SW620的凋亡作用, 采用western blotting技术检测相关凋亡蛋白的表达情况。结果: 1) 羊肚菌多糖对人结肠癌细胞SW620的体外增殖、细胞迁移、细胞集落形成具有抑制作用, 其作用24 h的IC₅₀为1220 ± 50 μg/mL, 48 h的IC₅₀为968 ± 63 μg/mL; 2) 羊肚菌多糖通过凋亡途径抑制SW620细胞的增殖; 3) 在羊肚菌多糖的作用下抗凋亡蛋白Bcl-2的表达下降, 而凋亡蛋白Bax和caspase-3的表达上升。结论: 羊肚菌多糖能显著抑制人结肠癌细胞SW620的增殖, 并通过上调Bax和caspase-3的表达和下调Bcl-2的表达诱导SW620细胞凋亡。

关键词

羊肚菌多糖, 结肠癌细胞, 抑制作用

Inhibitory Effect of *Morchella* Polysaccharide on the Proliferation of Human Colon Cancer Cell Line SW620 *in Vitro*

Xiaofei Liu, Lili Chen, Zhongkun Jin, Yiran Duan, Yi Li, Mingtang Li*

School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun Jilin
Email: 2580050412@qq.com, *1991800031@cust.edu.cn

Received: Jun. 7th, 2021; accepted: Jul. 28th, 2021; published: Aug. 4th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 刘晓飞, 陈丽莉, 金忠琨, 段怡然, 李翼, 李明堂. 羊肚菌多糖对人结肠癌细胞 SW620 体外增殖的抑制作用[J]. 食品与营养科学, 2021, 10(3): 199-205. DOI: 10.12677/hjfn.2021.103023

Abstract

Objective: To study the inhibitory effect of *Morchella* polysaccharide on human colon cancer cell line SW620 *in vitro*. **Methods:** MTT assay, scratch wound-healing and colony-forming analysis were used to detect the inhibitory effect of *Morchella* polysaccharide on the proliferation of human colon cancer cell SW620 *in vitro*, flow cytometry was used to detect the apoptosis effect of *Morchella* polysaccharide on human colon cancer cell SW620, and western blotting was used to detect the expression of related apoptosis proteins. **Results:** 1) *Morchella* polysaccharide treatment resulted in inhibition of proliferation, migration and colony formation of SW620 cancer cell in a time and dose-dependent, and the IC₅₀ of *Morchella* polysaccharide is 1220 ± 50 µg/mL for 24h and 968 ± 63 µg/mL for 48 h; 2) *Morchella* polysaccharide inhibits the proliferation of SW620 cells through the apoptotic pathway; 3) *Morchella* polysaccharide treatment-induced SW620 cancer cell apoptosis through up-regulated the expression of caspase-3 and Bax and down-regulated Bcl-2 levels. **Conclusion:** *Morchella* polysaccharide is a potent inhibitor of colon cancer growth by induction of SW620 cell apoptosis through intrinsic apoptosis pathway.

Keywords

Morchella Polysaccharide, Colon Cancer Cell, Inhibition

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结肠癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，其发生率较高，死亡率约为9.2% [1]。

羊肚菌(*Morchella esculenta* L.)是一种珍稀的食用菌，属盘菌目、羊肚菌科、羊肚菌属，分布在我国河南、陕西、甘肃、青海、西藏、新疆、四川、山西、吉林等地区[2]。研究表明，羊肚菌多糖能够提高机体免疫力[3]，诱导 HepG2 [4]、HT-29 [5]等肿瘤细胞凋亡。

目前国内相关研究多以 HT-29 [5]细胞系为研究对象，对 SW620 细胞的研究尚未见报道。本文以人结肠癌细胞 SW620 为实验材料，证实了羊肚菌多糖能够抑制结肠癌细胞的体外增殖、迁移、细胞集落形成，诱导结肠癌细胞的凋亡和相关凋亡蛋白的表达，为进一步研究羊肚菌多糖的抗肿瘤作用提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 主要试剂

羊肚菌多糖(长春理工大学王一东老师惠赠) [6]，人结肠癌细胞 SW620 (上海复祥)，结晶紫染液(上海碧云天)，细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天)，四甲基偶氮唑蓝粉末(Geniview)，胎牛血清(Sigma)，L15 培养基(Sigma)，细胞培养板(Corning)，鼠抗人 caspase-3、Bax、Bcl-2、β-actin 单克隆抗体(上海碧云天)，羊抗鼠辣根过氧化物酶标二抗(Sigma)。

2.1.2. 主要仪器

全自动酶标仪(Thermo Multiskan Ascent)、流式细胞仪(Beckman Coulter)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 细胞增殖抑制分析(MTT 法)

取对数生长期细胞, 稀释细胞浓度为 5×10^4 /ml, 以每孔 100 μ l 接种于 96 孔培养板, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳、饱和湿度条件下培养 6 h; 实验设空白试剂组(只含培养基)、对照组和实验组。细胞贴壁后, 实验组加入终浓度分别为 400 μ g/mL、600 μ g/mL、800 μ g/mL、1000 μ g/mL、1200 μ g/mL、1400 μ g/mL、1600 μ g/mL 的羊肚菌多糖溶液, 对照组加入不含羊肚菌多糖的培养液。分别培养 24 h 和 48 h 后, 每孔加入 MTT 10 μ L, 终浓度为 500 μ g/mL, 重新放入培养箱中继续培养 4 小时后终止培养; 吸弃培养液, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 空气浴振荡器中, 水平轻微振荡 2 min, 使结晶物完全溶解; 在酶联免疫检测仪(570 nm 波长处)上测定各孔光吸收度 OD 值。记录实验结果并按下列公式计算: 细胞存活率(%) = (A570 实验 - A570 空白)/(A570 对照 - A570 空白) \times 100。实验组每个浓度梯度设 3 个复孔。

2.2.2. 细胞迁移分析

取稀释至浓度为 1×10^4 的对数生长期的细胞接种于 6 孔板上。待细胞生长至 90% 融合时, 去除完全培养基, PBS 清洗, 用无血清培养基同步化培养 12 h。然后沿板孔直径划一条直线, 用 PBS 轻柔洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基。同时加入羊肚菌多糖(终浓度为 1000 μ g/mL 和 1200 μ g/mL), 设立空白对照, 每组设三个复孔。放到 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养继续培养 24 h。

2.2.3. 集落形成分析

取对数生长期的细胞, 以每孔 300 个活细胞接种于 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳、饱和湿度条件下培养 6 h; 实验组分别加入终浓度为 1000 μ g/mL, 1200 μ g/mL 的羊肚菌多糖培养溶液, 对照组加入等量正常培养液, 继续培养 24 h; 去掉培养液后, 再在不含羊肚菌多糖的完全培养液中培养 10 天。细胞集落用 PBS 洗涤 2 次, 并在室温下在 4% 多聚甲醛中固定 10 min, 再用 PBS 洗涤 2 次, 随后用结晶紫染色; 观察实验结果, 并与未经处理的细胞进行比较。

2.2.4. 细胞凋亡分析

取对数生长期细胞, 稀释细胞浓度为 1.0×10^5 /mL, 接种于 6 孔培养板, 每孔 2 ml, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳、饱和湿度条件下培养 6 h; 实验组分别加入终浓度分别为 1000 μ g/mL 和 1200 μ g/mL 的羊肚菌多糖培养溶液, 设三组重复, 对照组加入等量的全培养液, 培养 24 h; 将细胞培养液吸出置于 10mL 离心管内, 加入适量胰蛋白酶细胞消化液, 室温孵育 3 分钟后, 加入原先吸出的细胞培养液, 轻轻吹打使贴壁细胞吹打下来时, 转移至离心管内, 1000 转/min 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞; 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数; 取 10 万重悬细胞, 1000 转/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 分别加入 2.5 μ L Annexin V-FITC 和 2.5 μ L PI (碘化丙啶)混匀液, 室温下避光孵育 10 min, 立即进行流式细胞仪检测。

2.2.5. Western blotting 分析

在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 将培养的羊肚菌多糖处理组和对照组细胞在蛋白裂解液(含 0.001 mol/L EDTA, 0.002 mol/LPMSF, 10 μ g/mLaprotinin, 10 μ g/mLleupeptin)中裂解。12000 转/min 离心 5 min, 取上清, 应用蛋白定量试剂盒表示的方法定量, 用 SDS-PAGE 上样缓冲液调节蛋白浓度为 5 μ g/ μ L, 在沸水中煮沸 10 min。取 10 μ L 蛋白样品在 2% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 转膜后(PVDF), 将 PVDF 膜分别与 β -actin 单克隆抗体(1:500), 兔抗小鼠 caspase-3、Bax、Bcl-2 单克隆抗体(1:1000)室温孵育 1 h, 用 TBST 缓冲液充分漂洗后, 再分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:5000), 室温孵育 1 h, TBST 缓冲液充分漂洗后, 加入 ECL 化学发光底物, 在暗室中底片曝光。

3. 结果

3.1. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞增殖

如图 1 所示, MTT 分析结果表明羊肚菌多糖对 SW620 细胞具有抑制增殖的作用, 并呈时间及剂量依赖性(图 1)。与对照相比, 实验组的细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。统计分析表明羊肚菌多糖处理 24 h 后的 SW620 细胞 IC_{50} 值为 $1220 \pm 50 \mu\text{g/mL}$, 处理 48 h 后的 IC_{50} 值为 $968 \pm 63 \mu\text{g/mL}$ 。

3.2. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞迁移

细胞迁移是癌细胞增殖能力的重要指标[7]。因此, 本实验考察了羊肚菌多糖对 SW620 迁移能力的影响。如图 2(a)所示, 羊肚菌多糖抑制了细胞的迁移。对照组的细胞向划线区域迁移明显, 划线区域变窄, 而实验

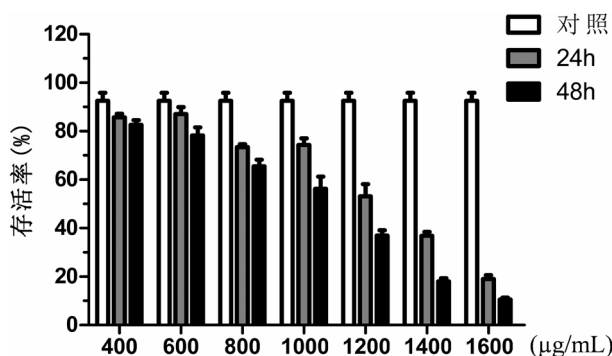
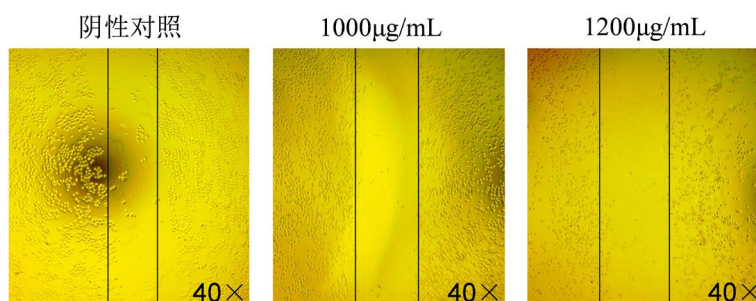
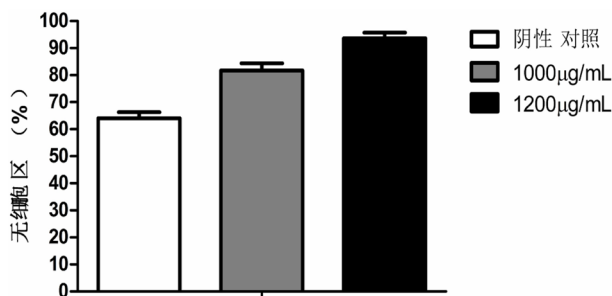


Figure 1. *Morchella* polysaccharide inhibits proliferation of SW620 cell

图 1. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞增殖的 mtt 分析



(a)



(b)

注: 图 A 为羊肚菌多糖对细胞迁移的影响, 图 B 为无细胞区相对宽度的统计分析

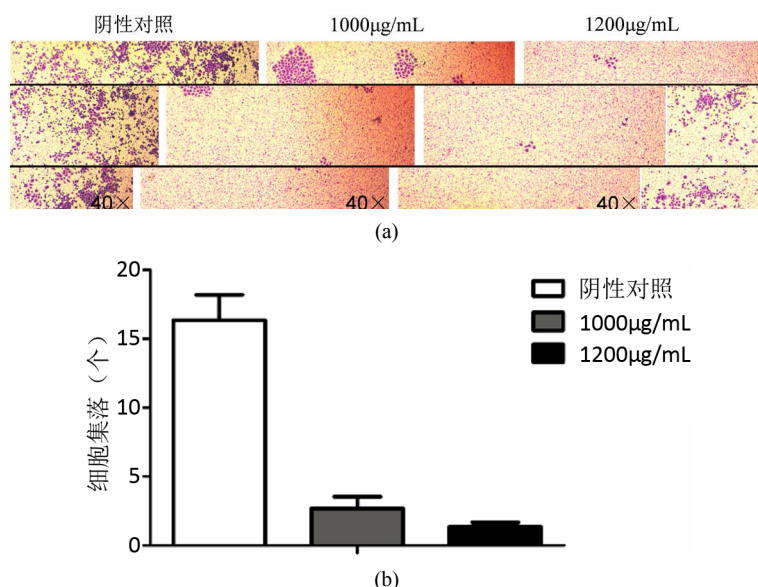
Figure 2. *Morchella* polysaccharide inhibits migration of SW620 cells

图 2. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞的迁移

组(1000 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$)的细胞向划线区域迁移较少或不明显;如图 2(b)所示,以 0 h 的划线区域的宽度为参照,将培养 24 h 后无细胞区宽度与之的比值进行统计分析,实验组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

3.3. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞集落形成

细胞集落形成也是癌细胞增殖的一项重要指标[8]。如图 3(a)所示,羊肚菌多糖对 SW620 细胞的集落形成具有抑制作用。对照组单个细胞集落形成能力较强,而实验组细胞则随羊肚菌多糖浓度增加集落形成能力减弱。药物浓度越高,单个细胞集落形成能力越弱且成剂量依赖;如图 3(b)所示,将大于 10 个细胞的集落个数进行统计分析,实验组与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

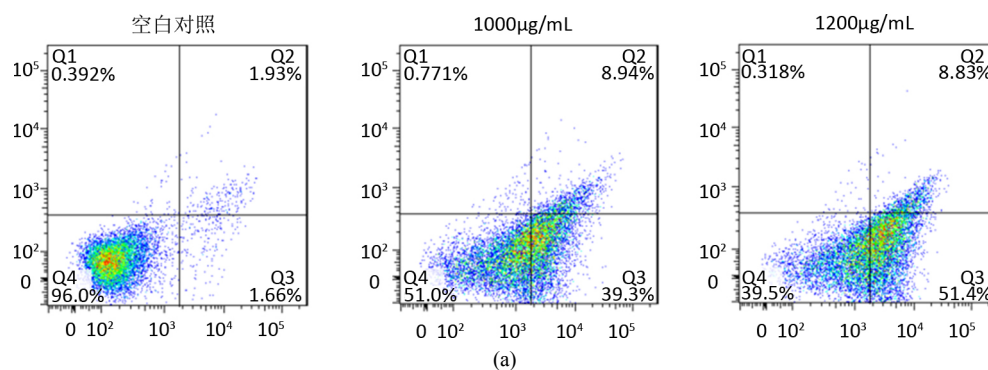


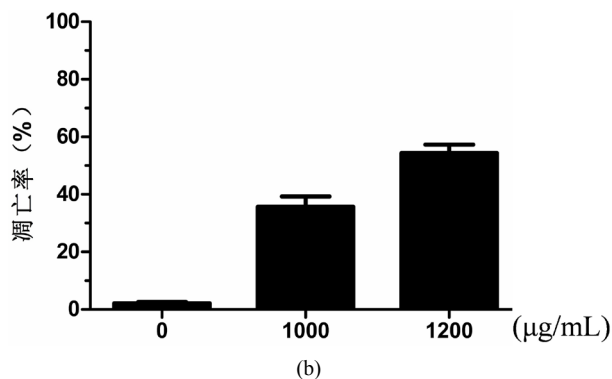
注:图 A 为羊肚菌多糖对细胞集落形成的影响,图 B 为细胞集落数量的统计分析

Figure 3. *Morchella* polysaccharide inhibits colony formation of SW620 cells
图 3. 羊肚菌多糖抑制 SW620 细胞集落形成

3.4. 羊肚菌多糖诱导 SW620 细胞凋亡

MTT 的实验结果表明,羊肚菌多糖能够抑制 SW620 细胞的增殖,但抑制的途径是通过坏死还是凋亡需要通过实验验证。因此,用含 1000 $\mu\text{g/mL}$, 1200 $\mu\text{g/mL}$ 的羊肚菌多糖的培养液分别处理细胞 24 h 后,采用流式细胞仪检测分析。如图 4(a)所示,羊肚菌多糖能够诱导细胞凋亡,且呈剂量依赖;如图 4(b)所示,实验组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。





注：图 A 为流式细胞检测结果，图 B 为细胞凋亡统计分析

Figure 4. *Morchella* polysaccharide induce SW620cell apoptosis
图 4. 羊肚菌多糖诱导细胞凋亡

3.5. 羊肚菌多糖对凋亡相关蛋白的影响

主要的凋亡相关蛋白包括 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3。Western blot 分析结果如图 5 所示，羊肚菌多糖能够诱导凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达量上调，诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量下调，并且呈剂量依赖性。

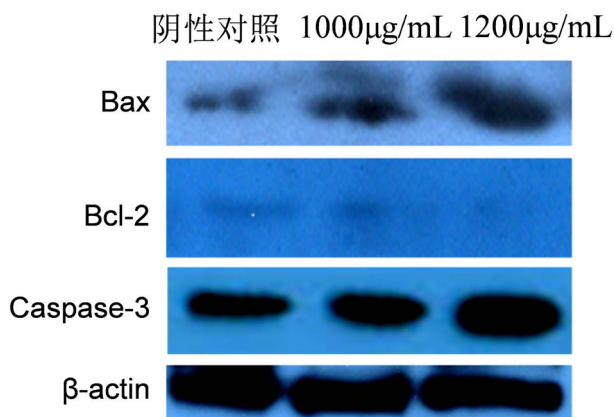


Figure 5. The effect of *Morchella* polysaccharide on the expression of major apoptosis regulatory proteins
图 5. 凋亡相关蛋白的表达

4. 讨论

在我国，由于饮食结构的改变，结肠癌发病率和死亡率均处于较快速增长阶段。目前，临床治疗结肠癌的方法是手术切除后，再用放射疗法或用 5-氟尿嘧啶等化疗药治疗结肠癌，但毒副作用较大，易引起患者强烈的不适[9]。

早先的研究发现，从很多植物或微生物中提取的多糖具有抑制癌细胞增殖的药理活性且毒副作用较小[4] [5] [10]。这些研究为寻找抗肿瘤活性强、毒副作用小，提高患者的生活质量的天然药物提供了一个新的研究方向。

细胞凋亡分内源和外源两种途径。在内源性途径中，线粒体膜在药物的作用下裂解，释放出细胞色素 C (Cytochromes C)和凋亡诱导因子(AIF)。细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)相互作用激活 caspase 9，而活化的 caspase 9 启动 caspase 3 的活化，从而启动细胞凋亡[11]。该过程受到 Bcl-2 蛋白家

族中的促凋亡蛋白成员 bax 和抗凋亡蛋白成员 Bcl-2 的调节[12]。

本研究的数据证明了羊肚菌多糖能够抑制结肠癌细胞 SW620 的增殖、迁移和细胞集落的形成, 诱导癌细胞凋亡。通过凋亡相关蛋白的表达分析显示, 促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达上升, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达下降。图 1 的结果表明羊肚菌多糖对结肠癌细胞 SW620 的增殖抑制呈现剂量和时间依赖, 其 24 h 和 48hIC₅₀ 值分别为 1220 ± 50 μg/mL 和 968 ± 63 μg/mL, 略高于崔丽华[4]以 HepG2 为研究对象和刘超[5]以 HT-29 为研究的实验结果, 这可能是所采用的癌细胞系不同所致。图 2 和图 3 的结果表明羊肚菌多糖能够抑制 SW620 细胞的迁移和集落形成能力, 该实验结果未见有关报道。图 4 的结果表明羊肚菌多糖通过细胞凋亡的方式抑制了 SW620 细胞的增殖, 该结果与刘超[5]和陈义勇[10]的研究相符。图 5 的结果表明羊肚菌多糖能够诱导促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达量上升、抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量下降, 该结果与之前的相关研究结果相符[4] [9] [10]。由于上述三种凋亡相关蛋白是内源性途径即线粒体途径的主要发动蛋白, 说明羊肚菌多糖通过线粒体途径诱导结肠癌细胞 SW620 的凋亡。

综上所述, 羊肚菌多糖通过细胞凋亡的方式抑制了结肠癌细胞 SW620 的增殖, 并且抑制了 SW620 细胞的迁移和增殖。本研究结果为进一步研究和开发羊肚菌多糖提供了新的实验依据, 为结肠癌的临床治疗提供了新的参考途径。

基金项目

吉林省大学生创新创业训练计划项目(20201018)。

参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2018) Lobar Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] 朱林, 程显好, 田吉藤. 羊肚菌研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(10): 4054-4057.
- [3] 张利平, 陈彦, 王子尧. 羊肚菌胞外多糖免疫活性研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(3): 47-49.
- [4] 崔华丽. 羊肚菌多糖的结构特点和抗肿瘤机制的研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽大学, 2011.
- [5] 刘超. 液体深层发酵羊肚菌胞内多糖提取、结构分析及抗结肠癌作用研究[D]: [博士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [6] 梁宇芝, 王清爽, 王一东. 羊肚菌多糖应急性抗疲劳成分的初步分离与鉴定[J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2020, 43(3): 130-135.
- [7] Shiozaki, A., Bai, X., Shen-Tu, G., Moodley, S., Takeshita, H., *et al.* (2012) Claudin 1 Mediates TNF α -Induced Gene Expression and Cell Migration in Human Lung Carcinoma Cells. *PLoS ONE*, **7**, e38049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038049>
- [8] Gao, W., Zhang, X.Y., Jiang, R., *et al.* (2011) Lentivirus-Mediated RNA Interference and Over-Expression of Over-Expression of CDKA2AP1 cDNA Regulate CDKA2AP1 Expression in Human Lung Cancer A549 Cells. *Chemical Research in Chinese Universities*, **27**, 445-449.
- [9] Li, Q., Zhou, S., Jing, J., *et al.* (2013) Oligosaccharide from Apple Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in HT29 Human Colon Cancer Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, **57**, 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.034>
- [10] 陈义勇. 桦褐孔菌多糖纯化、结构及其抗肿瘤机制研究[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [11] Adams, J.M. and Cory, S. (2007) The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- [12] Mallat, Z. and Tedgui, A. (2000) Apoptosis in the Vasculature: Mechanisms and Functional Importance. *British Journal of Pharmacology*, **130**, 947-962. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703407>