

· 基础研究 ·

蛹虫草提取物对人结肠癌细胞 SW111C 抑制作用的研究

纪朋艳¹, 罗 速^{2△}, 姜艳霞¹

(1. 吉林医药学院医学实验中心, 吉林 132013; 2. 北华大学, 吉林 132013)

摘要:目的 探讨蛹虫草提取物(RW)对结肠癌细胞株 SW111C 的抑制作用及可能的机制。方法 通过四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、台盼蓝拒染法检测 RW 对 SW111C 增殖的抑制作用,琼脂糖(DNA)凝胶电泳检测细胞凋亡;流式细胞术(FCM)PI 染色法检测 RW 所引起 SW111C 的凋亡百分率和细胞周期的分布变化。**结果** MTT 法与台盼蓝拒染法检测结果表明 RW 对 SW111C 细胞有明显抑制作用,RW 作用 24、48、72 h 后的 IC₅₀ 分别为 77.78、32.19、26.20 mg/L,且这种抑制作用呈现浓度和时间的依赖性;DNA 凝胶电泳检测发现 32 mg/L RW 组出现 DNA“梯状”条带;FCM 检测发现凋亡率随浓度的增高而增高,2、8、32 mg/L 的凋亡率分别为(6.8±2.32)%、(11.8±2.58)%、(16.9±1.93)% ,与对照组[(1.9±1.3)%]相比差异有统计学意义(P<0.01)。细胞周期阻滞于 G₁ 期,S 期细胞减少。**结论** (1)RW 对体外培养的 SW111C 细胞的增殖有抑制作用,并呈现浓度和时间的依赖性,这种抑制作用可能与诱导 SW111C 细胞凋亡、改变其细胞周期分布有关。

关键词:结肠肿瘤;蛹虫草;细胞凋亡;细胞周期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)01-0061-03

Inhibitory effects of extract from *Cordyceps militaris* on human colon cell line SW111C in vitroJi Pengyan¹, Luo Su^{2△}, Jiang Yanxia¹

(1. Medicine Experiment Center, Jilin Medical College, Jilin 132013, China; 2. Beihua University, Jilin 132013, China)

Abstract: Objective To investigate the proliferation effect of human colon cell line SW111C by extract from *Cordyceps militaris* in vitro and to explore its anti-tumor mechanism from two factors: apoptosis, cell cycle. **Methods** The influences of extract from *Cordyceps militaris* on cell growth inhibition were examined by MTT assay and trypan blue dyeing; Apoptosis was detected by flow cytometry, the changes of cell cycle were detected by FCM. **Results** The growth inhibition of SW111C treated by various concentration of extract from *Cordyceps militaris* after different time was observed. The IC₅₀ for SW111C cell were 77.78, 32.19, 26.20 mg/L after 24, 48, 72 h incubation respectively. The results showed that the growth inhibition presented dose and time dependent. The extract can induce SW111C cell apoptosis and block the cell cycle at G₁ phase treated for 72 hours. **Conclusion** The extract from *Cordyceps militaris* effectively inhibits the growth of human colon cancer cell lines SW111C in a dose and time dependent. The growth inhibitory effect of the extract on SW111C cells are involved in induction of cell apoptosis, block of the cell cycle and down-regulation of the telomerase activity.

Key words: colonic neoplasms; *Cordyceps militaris*; apoptosis; cell cycle

蛹虫草又名北冬虫夏草、北虫草、蛹草等,与名贵中药冬虫夏草为同属真菌植物。《全国中草药汇编》记载:“蛹虫草(北虫草)的子实体及虫体也可作为冬虫夏草入药”^[1]。由于冬虫夏草在自然条件下不能长期保存,加之近年来环境条件日益受到破坏和无限的人工采集,虫草资源越来越贫乏。而目前人工栽培蛹虫草已成功^[2-5],因此,对其有效成分的研究、开发具有更深的意义。国内外关于蛹虫草提取物(RW)对结肠癌细胞的作用及机制鲜有报道。本研究通过体外实验初步探讨 RW 对人结肠癌细胞株 SW111C 的作用,为其作为一种抗癌药物或防癌保健药应用于临床提供一定的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞 结肠癌细胞株 SW111C 购自吉林省肿瘤研究所。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.1.2 药物与试剂 RW(由北华大学崔新颖教授所赠)用无

菌二甲亚砷(DMSO)助溶,其中 DMSO 的浓度小于 0.1%。DMEM(低糖)培养基购自 GIBCO 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Genview 公司,台盼蓝购自 Sigma 公司,凋亡 DNA Ladder 提取试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.1.3 仪器与设备 流式细胞仪(Beckman Coulter Epics XL)、二氧化碳培养箱(日本平泽制作所)、倒置显微镜(Olympus)、低温超速离心机(Eppendorf 5417R 型)、酶联免疫检测仪(南京华标仪器厂)等。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法观察 RW 对 SW111C 细胞增殖的抑制作用 细胞以每孔 5×10³ 个,体积 200 μL 接种于 96 孔板,37℃、5% CO₂ 温箱内培养 24 h。吸弃培养液,实验组分别用浓度为 2、4、8、16、32 mg/L 的 RW 药液 200 μL 处理;阴性对照组加入完全培养液 200 μL;调零组加入完全培养液 200 μL;各设复孔 3 个。注意在细胞加药后的第 2 天进行 1/2 的换液或换药,分别培养细胞 24、48、72 h 后,每天取一块板,吸弃培养液,加入浓

度为 5 g/L 的 MTT, 20 μ L/孔。继续孵育 4 h 后吸出各孔上清液, 加入 DMSO 150 μ L/孔, 振荡 10 min。酶标仪以 570 nm 为检测波长测定各孔光密度值(A 值)。细胞增殖的抑制率=(对照组 A 值-用药组 A 值)/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.2 台盼蓝拒染法检测 RW 对肿瘤细胞的杀伤作用 培养细胞、药物处理同 MTT 法, 各设复孔 3 个。分别在 48、72 h 后各取一块板, 对细胞进行常规消化, 制备单细胞悬液。悬液均匀后, 立即向一青霉素小瓶中滴入细胞悬液 9 滴, 再滴入台盼蓝染液 1 滴, 混匀, 放置 3~5 min。在 15 min 内用血细胞计数板计数 200 个细胞。活细胞率=未染色细胞数/细胞总数 \times 100%, 对照组活细胞率应在 90% 以上。

1.2.3 琼脂糖(DNA)凝胶电泳检测细胞凋亡 取对数生长期 SW111C 细胞以 8×10^4 个/mL 接种于 25 mL 培养瓶, 每瓶 2 mL。细胞培养过夜, 阴性对照组加入相应体积的完全培养液。实验组分别加入 2、8、32 mg/L 的药液, 每浓度组 3 瓶。药物加入 72 h 后进行消化收集细胞。按照 DNA Ladder 抽提试剂盒说明书进行操作。将获得的 DNA 应用 20 g/L DNA 凝胶电泳。电泳完成后取出凝胶于紫外透射仪下观察并照相。

1.2.4 流式细胞术(FCM)PI 染色法检测细胞凋亡率及细胞周期变化 取对数生长期的细胞以 8×10^4 个/mL 接种于 12 孔培养板内, 每孔 1 mL。细胞培养过夜, 阴性对照组加入相应体积的完全培养液。实验组分别加入 2、8、32 mg/L 的药液, 每个浓度加 3 瓶。药物作用 72 h 后收获离心, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗后再离心, 70% 的冷乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存过夜。弃去 70% 的乙醇, 用 PBS 漂洗后以 100 目筛网过滤, 再离心(1 000 r/min, 5 min), 弃 PBS。加入 PI 工作液 0.5 mL, 室温避光 30 min, 上机检测。使用 MultiCycle 软件分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计分析软件, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组均数间比较采用 *t* 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析, 对抑制率与 RW 浓度与作用时间进行直线相关回归分析。

2 结 果

2.1 MTT 实验结果 结果显示 RW 对体外培养的 SW111C 细胞的生长具有抑制作用, 随着 RW 浓度的升高和时间的增长, 其细胞增殖的抑制率明显增加(表 1)。

表 1 RW 对 SW111C 细胞抑制率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 抑制率(%) | | |
|------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 对照组 | 0 | 0 | 0 |
| RW 组(mg/L) | | | |
| 2 | 2.95 \pm 1.37 | 6.96 \pm 1.63 | 11.50 \pm 4.30* |
| 4 | 3.80 \pm 1.86 | 12.37 \pm 1.61 Δ | 17.24 \pm 2.78* |
| 8 | 8.43 \pm 1.21 | 26.03 \pm 3.40* | 30.11 \pm 3.52* |
| 16 | 12.24 \pm 2.00 Δ | 36.86 \pm 2.34* | 41.30 \pm 4.72* |
| 32 | 19.41 \pm 2.25* | 45.62 \pm 1.85* | 54.61 \pm 25.12* |

Δ : $P<0.05$, *: $P<0.01$, 与对照组同时时间点比较。

直线相关回归分析表明, RW 对 SW111C 细胞增殖的抑制作用具有剂量、时间依赖效应。处理 24、48、72 h 的 IC₅₀ 值分别为 77.78、32.19、26.20 mg/L。

2.2 台盼蓝拒染法检测结果 经 RW 作用 48、72 h 后, 随着浓度的增大, SW111C 细胞存活率逐渐降低(图 1)。

2.3 DNA 凝胶电泳结果 RW 作用 72 h 后 DNA 抽提 DNA 凝胶电泳结果显示, 2.8 mg/L RW 组处理的 SW111C 细胞的 DNA 凝胶电泳图谱未出现明显可辨的“梯状”条带, 32 mg/L RW 组的电泳图谱出现“梯状”条带(图 2)。

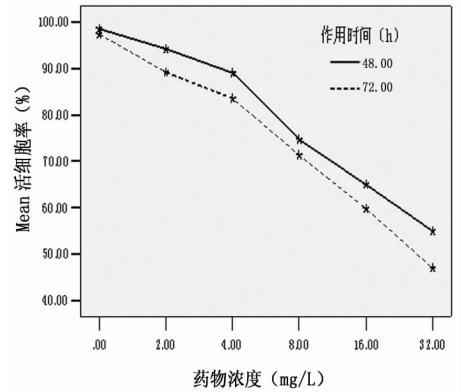
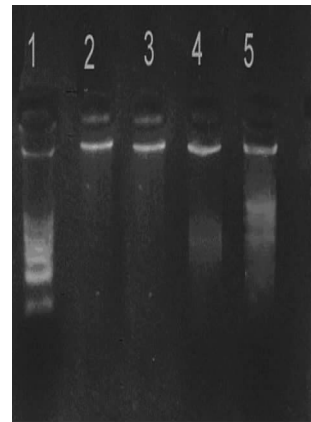


图 1 RW 对 SW111C 细胞存活率的影响



1: 100 bp DNA marker; 2: 对照组(未加药细胞组); 3、4、5: RW 组(浓度分别为 2、8、32 mg/L)。

图 2 RW 作用后细胞 DNA 凝胶电泳结果

表 2 不同浓度的 RW 对 SW111C 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 细胞周期 | | |
|------------|------------------|------------------|------------------|
| | G ₁ | S | G ₂ |
| 对照组 | 56.7 \pm 2.57 | 21.2 \pm 3.63 | 22.1 \pm 3.06 |
| RW 组(mg/L) | | | |
| 2 | 63.2 \pm 1.33* | 18.3 \pm 3.32 | 18.5 \pm 2.51 |
| 8 | 65.7 \pm 2.48* | 13.7 \pm 3.32* | 20.6 \pm 2.23 |
| 32 | 76.1 \pm 2.93* | 11.5 \pm 2.84* | 12.4 \pm 3.51* |

*: $P<0.01$, 与对照组比较。

2.4 FCM 检测细胞周期和凋亡率的结果 RW 作用 72 h 后, SW111C 细胞周期和凋亡率都发生了明显的变化。随着 RW 浓度的提高和作用时间的延长, G₁ 期细胞明显增多, 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$); S 期细胞明显减少, 8、32 mg/L RW 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$); G₂ 期细胞减少, 但不明显。说明细胞大多阻滞于 G₁ 期, 并呈一

定的浓度依赖性(表 2)。FCM 结果显示 RW 作用后都发现了位于 G₁ 期前的亚 G₁ 峰,凋亡率均明显高于对照组,差异有统计学意义,且凋亡率呈浓度相关性(表 3)。

表 3 不同浓度的 RW 对 SW111C 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 凋亡率(%) |
|------------|------------|
| 对照组 | 1.9±1.3 |
| RW 组(mg/L) | |
| 2 | 6.8±2.32* |
| 8 | 11.8±2.58* |
| 32 | 16.9±1.93* |

*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨 论

蛹虫草中含有多种抗肿瘤活性成分,虫草素、虫草酸、虫草多糖、麦角甾醇、超氧化物歧化酶、硒等,并且可单独或共同发挥抗肿瘤作用^[6-11]。本研究中的 RW 是从蛹虫草提取出的活性成分。MTT 法和台盼蓝拒染法检测结果显示 RW 在 2~32 mg/L 的浓度范围内对 SW111C 细胞增殖有不同程度抑制,抑制率与 RW 浓度和作用时间呈依赖关系。恶性肿瘤不仅是细胞增殖和分化异常的疾病,也是细胞凋亡异常的疾病^[12],细胞凋亡的减少可引起肿瘤的发生且通过逃避凋亡而促进肿瘤细胞的恶性转化及演进^[13]。因此,抗癌药物的疗效不仅取决于药物与各自靶点的相互作用,也取决于药物诱导细胞发生程序性死亡的能力^[14]。本实验中 DNA 凝胶电泳及 FCM 检测结果显示,RW 可引起 SW111C 细胞的凋亡,且凋亡率呈浓度相关性,与 MTT 法测得的对增殖的抑制相一致。

本研究发现 RW 作用 72 h 后可使 SW111C 细胞受阻于 G₁ 期,导致 S 期细胞降低。而肿瘤细胞增殖的快慢,主要取决于细胞 G₀/G₁ 期的长短,G₀/G₁ 期短,肿瘤细胞增殖快,处于 G₀/G₁ 期的细胞数少^[15],故 RW 对 SW111C 细 G₁ 期阻滞可能使细胞生长周期延长,细胞的恶性增殖减慢。

综上所述,RW 对结肠癌细胞 SW111C 的生长具有明显抑制作用,且这种抑制作用呈时间剂量依赖方式。这种对增殖的抑制作用与诱导 SW111C 细胞凋亡、改变其细胞周期分布有关。但 RW 由哪些物质组成、具体哪些成分起作用等问题尚待进一步研究;另一方面,更要进行动物实验及临床研究,开发出低毒、高效能的蛹虫草提取物,为人类结肠癌的防治开拓新的途径。

参考文献:

[1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上)[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:275-276.

[2] 何次平. 蛹虫草栽培工艺要领[J]. 食用菌,2003,16(增刊):36-37.

[3] 李祥麟,黄檀溪. 北冬虫夏草的选育及其抗衰实验研究[J]. 海峡科技与产业,2004,11(1):27-28.

[4] 李娜,毛永强. 蛹虫草工厂化袋栽技术要点[J]. 山西农业科学,2010,38(2):122-123.

[5] 胡树贵,马莹,郭晓凡,等. 蛹虫草瓶栽高产技术[J]. 辽宁林业科技,2010,4(1):61-62.

[6] Yoshikawa N, Nakamura K, Yamaguchi Y, et al. Antitumor activity of cordycepin in mice[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2004,31(1):51-53.

[7] Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation[J]. Anticancer Res,2006,26(1):43-47.

[8] Li SP, Zhao KJ, Ji ZN, et al. A polysaccharide isolated from Cordyceps sinensis, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury[J]. Life Sci,2003,73:2503-2513.

[9] 孙科峰,古伟,刘丽,等. 蛹虫草子实体抗肿瘤作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志,2004,31(6):520-521.

[10] 樊慧婷,林洪生,李杰,等. 人工蛹虫草子实体对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2009,16(15):1130-1134.

[11] Kodama EN, McCaffrey RP, Yusa K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT⁺) leukemic cells[J]. Biochem Pharmacol,2000,59(3):273-281.

[12] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science,1995,267:1456-1462.

[13] Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells in vitro [J]. Leuk Lymphoma, 2000,37(1):53-63.

[14] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998:836-842.

[15] Subbegowda R, Frommel TO. Aspirin toxicity for human colonic tumor cells from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest [J]. Cancer Res, 1998, 58(13):2772-2776.

(收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-08-25)

启事:本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道,欢迎投稿。