

发酵虫草菌粉对人肝癌细胞增殖、凋亡及 VEGF, MMP-2 表达的影响

曾志涛¹, 傅纛^{1*}, 熊耀斌², 资晓飞¹, 彭中娟¹, 黄玲玲¹, 杨慧², 俞红²

(1. 南昌大学第二附属医院, 南昌 330006; 2. 江西省医学科学研究所, 南昌 330006)

[摘要] 目的:探讨从天然冬虫夏草中分离出的虫草拟青霉 Cs-4 菌株,经人工发酵所得发酵虫草菌粉对 SMMC-7721 人肝癌细胞的生长抑制作用。方法:20 只体重(200±20)g 雄性 SD 大鼠随机分为 4 组(每组 5 只):空白组及 Cs-4 低、中、高剂量组,空白组 ig 予蒸馏水,Cs-4 低、中、高剂量组(0.77,1.54,3.08 g·kg⁻¹,ig);给药 3 d 后,制备含药血清。肝癌细胞悬液调整至 4×10⁴/mL,96 孔板每孔加入 100 μL,培养 24 h 后加入大鼠含药血清及顺铂注射液;干预 48 h MTT 法测各组细胞增殖抑制率。将 SMMC-7721 细胞悬液调整至 2.8×10⁴/mL,接种于 6 孔板培养 24 h,加入大鼠含药血清及顺铂,干预培养 48 h 后 Annexin V-FITC/PI 染色,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率;ELISA 检测各组细胞上清液中血管内皮生长因子(VEGF),金属基质蛋白酶-2(MMP-2)表达量。结果:SMMC-7721 细胞增殖被 Cs-4 含药血清明显抑制(与空白组比较 P<0.05),低、中、高剂量组抑制率分别为 12.2%,23.2%,38.1%,呈剂量依赖性(Cs-4 不同剂量组间比较 P<0.05)。Cs-4 含药血清低、中、高剂量组细胞凋亡率分别为 13.9%,23.5%,24.9%,均高于空白组(P<0.05)。Cs-4 含药血清低、中、高剂量组细胞上清液中 VEGF 分别为 443.5,436.9,411.0 ng·L⁻¹,低于空白组(P<0.05);Cs-4 低、中、高剂量组细胞上清液中 MMP-2 浓度与空白组比无显著差异。结论:Cs-4 含药血清能抑制 SMMC-7721 细胞增殖,提高体外培养的 SMMC-7721 细胞凋亡率,抑制 SMMC-7721 细胞 VEGF 表达,提示 Cs-4 有抗肝癌作用,对 SMMC-7721 细胞 MMP-2 表达无显著影响。

[关键词] Cs-4 发酵粉;人肝癌细胞 SMMC-7721;增殖;凋亡;血管内皮生长因子;金属基质蛋白酶 2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0141-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090141

Effects of *Paecilomyces hepiali* on Proliferation, Apoptosis and Expression of VEGF, MMP-2 of SMMC 7721 Cells ZENG Zhi-tao¹, FU Ying^{1*}, XIONG Yao-bin², ZI Xiao-fei¹, PENG Zhong-juan¹, HUANG Ling-ling¹, YANG Hui², YU Hong² (1. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Academy of Medical Sciences, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of the Chinese caterpillar fungus isolated from natural *Paecilomyces hepiali* strain (Cs-4) inhibited by artificial fermentation, the Fermented-4 powder on SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cell growth. **Method:** Twenty male SD rats were randomly divided into four groups (n = 5): control group and Cs-4 low, medium and high dose groups, control group was treated with distilled water, Cs-4 low, middle and high dose groups were treated with distilled water to prepare the Cs-4 (0.77, 1.54, 3.08 g·kg⁻¹, ig) suspension, according to the 10 mL·kg⁻¹ body weight orally, 2 times twice a daily; after intragastric administration for 3 days, the serum containing drug was prepared. The liver cell suspension was adjusted to 4×10⁴ cells/mL, each hole of 96 hole plate was added with 100 μL cell suspension culture. After 24 h, the holes were respectively added with 160 μL cells culture fluid and 40 μL blank serum and containing Cs-4. After 48 h MTT detection was carried out, the inhibition rate of proliferation of cells was calculated. The SMMC-7721 cell suspension was adjusted to 2.8×10⁴ cells/mL, were cultured in 6 well plates (each hole 2 mL inoculation) for 24 h, the holes were added to 1.6 mL cells suspension and 0.4 mL blank serum and containing

[收稿日期] 20140223(007)

[基金项目] 江西省卫生计生厅中医药科研基金项目(2012A128)

[第一作者] 曾志涛,在读硕士,中西医结合临床专业,Tel:15057679687,E-mail:502924776@qq.com

[通讯作者] *傅纛,硕士,教授,硕士生导师,主任中医师,从事中医临床、教学与研究,Tel:13970975901,E-mail:yingfu-116@163.com

drug serum were added after 48 h, Annexin V-FITC/PI staining by flow cytometry was used to detect of apoptosis; expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) were detected with ELISA method. **Result:** MTT showed the proliferation of SMMC-7721 cells was significantly inhibited by containing Cs-4 serum compared with the blank control group ($P < 0.05$), the different dose inhibition rates were 12.2%, 23.2%, 38.1% in a dose-dependent manner. Apoptosis detection showed that in containing Cs-4 serum groups, the apoptosis rates were 13.9%, 23.5%, 24.9%, which was higher than those in the blank group ($P < 0.05$). In containing Cs-4 serum groups, the concentration of VEGF in supernatant was respectively 443.5, 436.9, 411.0 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, which was lower than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The containing Cs-4 serum can inhibit the proliferation and VEGF expression of SMMC-7721 cells, and increase the apoptosis of SMMC-7721 suggesting Cs-4 had anti-tumor metastasis action.

[Key words] fermented *Paecilomyces hepiali* powder; SMMC-7721 cells; proliferation; apoptosis; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinases-2

原发性肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病率在全球癌症中居第6位,死亡率居第三。肝癌的多数病例发生在发展中国家,特别是东亚地区。在我国肝癌发病率高达26.68/10万^[1],严重危害我国人民的健康和生命,抗肝癌药物的开发和研究十分重要。

发酵虫草菌粉(简称Cs-4)为从青海冬虫夏草*Paecilomyces hepiali*中分离所得的虫草拟青霉Cs-4菌株人工培育所得。早在1987年,Cs-4菌株就被江西济民可信药业有限公司开发制作成“金水宝胶囊”应用于临床。近年多项研究显示虫草类真菌及提取物具有抗肿瘤作用^[2-3]。有学者通过将Cs-4运用于恶性的临床治疗中,发现Cs-4能减轻肿瘤患者的放化疗反应,增强化疗药抗肿瘤作用^[4],提示Cs-4具有抗肿瘤潜力。本实验在研究Cs-4发酵粉对SMMC-7721细胞增殖、凋亡作用的同时,将SMMC-7721细胞血管内皮生长因子(VEGF),金属基质蛋白酶-2(MMP-2)分泌作为研究对象,探索Cs-4发酵粉的多靶点抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 动物和细胞株 清洁级雄性SD大鼠,体重(200±20)g,由江西中医学院实验动物科技中心提供,合格证号SCXK(赣)2011-0001。人肝癌细胞株(SMMC-7721,由江西省医学科学研究院提供)。

1.2 药物和试剂 胎牛血清(武汉三利生物技术有限公司,批号201307),RPMI 1640培养基(Hyclone USA,批号900138),Annexin V PI细胞凋亡双染试剂盒(上海贝博生物试剂公司,编号BB-4010),ELISA试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司,编号E-EL-H1445),0.25%胰蛋白酶(Amresco公司,批号201310),Cs-4发酵粉(江西济民可信金

水宝制药有限公司,批号20130928),顺铂注射液(1g·L⁻¹,南京制药厂有限公司,批号20100824),二甲基亚砜(DMSO,上海索莱宝生物科技有限公司,批号20130621)。

1.3 仪器 BX-51型显微镜(日本Olympus公司),iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司),Epicselite ESP型流式细胞仪(美国Coulter公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将冻存的SMMC-7721细胞从液氮罐中取出后,放入37℃水浴箱中复苏,并不时摇动。用吸管吸出细胞悬液,注入离心管,并加入适当RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清,100U·mL⁻¹青霉素,100U·mL⁻¹链霉素)稀释,1000r·min⁻¹,离心5min,收集细胞,重悬,台盼蓝染色检测细胞活力,置于37℃,5%CO₂细胞培养箱中常规培养,胰酶-EDTA消化液(0.25%)消化传代。传代3~4次后取对数生长期细胞进行实验。

2.2 含药血清制备 大鼠20只,按体重随机分为4组(5只/组):空白组及Cs-4低、中、高剂量组。空白组ig蒸馏水,Cs-4低、中、高剂量组(0.77,1.54,3.08g·kg⁻¹,ig),饲养3d,禁食不禁水12h后,ig给药1次,于2h后再次ig,第2次ig给药后1h,10%水合氯醛麻醉,无菌条件下打开腹腔,充分暴露下腔静脉采血,室温静置4h,3000r·min⁻¹,离心15min,分离血清,56℃水浴灭活30min,0.22μm微孔滤膜过滤,-20℃冰箱保存备用。

2.3 细胞分组 对照组:只加入细胞培养液;空白组:加入细胞培养液及空白组大鼠血清,血清体积分数为20%;顺铂组,终质量浓度为0.5mg·L⁻¹;加入细胞培养液及顺铂注射液;Cs-4低、中、高剂量组:加入细胞培养液及Cs-4各剂量组大鼠血清,血清体

积分数为 20%。

2.4 MTT 增殖抑制试验 对数生长期 SMMC7721 细胞消化后,离心,重悬,调整细胞密度为 4×10^4 /mL, 96 孔板每孔加入 100 μ L, 并设调零孔, 每组设 5 复孔, 常规培养 24 h 后弃细胞培养液, 实验孔分别加入 160 μ L 细胞培养液和 40 μ L 空白组大鼠血清及 Cs-4 低、中、高剂量大鼠血清(血清终体积均为 20%), 调零孔、对照孔加入 200 μ L 细胞培养液, 阳性对照孔加入 39.9 μ L 细胞培养液及 0.1 μ L 顺铂注射液终质量浓度为 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 各孔细胞上清液终体积为 200 μ L, 48 h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液(质量浓度为 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养箱中孵育 4 h, 吸尽上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 振荡 10 min, 用酶标仪测波长为 490 nm 时的吸光度(A)。计算各组细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = [1 - (\text{实验组 } A - \text{调零孔 } A) / (\text{空白组 } A - \text{调零孔 } A)] \times 100\%$$

2.5 细胞凋亡检测 取对数生长期 SMMC-7721 细胞, 消化制成单细胞悬液接种于 6 孔板, 每孔细胞密度为 2.8×10^4 /mL, 终体积为 2 mL, 常规培养 24 h 后, 弃原液, 实验孔分别加入 1.6 mL 细胞培养液和 0.4 mL 空白组大鼠血清及 Cs-4 低、中、高剂量大鼠血清(血清终体积均为 20%), 对照孔加入 2 mL 细胞培养液, 阳性对照孔加入顺铂干预, 各孔细胞上清液终体积为 2 mL。常规培养 48 h 后, 无菌条件下收集细胞上清液备用, 6 孔板内加入胰蛋白酶(不含 EDTA)消化细胞, 镜下观察细胞变圆, 细胞间隙出现即中止消化, $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集, 冷 PBS 洗 2 遍。400 μ L \times Binding Buffer 悬浮各组细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min, 加入 10 μ L 碘化丙啶(PI), 轻轻混匀, 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min。1 h 内用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

2.6 VEGF, MMP-2 表达检测 将细胞凋亡实验所收集细胞上清液, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 除去杂质及细胞碎片后进行 ELISA 实验, 检测各孔细胞上清液中 VEGF 浓度, 每孔取 3 个样品, 每样品设 3 个复孔。具体步骤严格按照试剂说明书操作。用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度(A), 以对照品的 A 为纵坐标, 对照品的质量浓度($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标, 绘制标准曲线并拟合标准曲线方程。通过样品的 A 在标准曲线方程内求出各样品 VEGF, MMP-2 表达浓度。

2.7 统计学处理 用 SPSS 20.0 统计软件进行统

计比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

3 结果

3.1 对人肝癌细胞增殖的影响 空白组与对照组 A 无统计学差异; 与空白组比较, SMMC-7721 细胞增殖被 Cs-4 含药血清明显抑制($P < 0.05$), 不同剂量组抑制率呈剂量依赖性且有所差异(Cs-4 不同浓度间比较 $P < 0.05$); 顺铂组抑制率高于 Cs-4 含药血清各剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 发酵虫草菌粉 Cs-4 含药血清对 SMMC7721 细胞增殖及细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of containing Cs-4 serun on proliferation and apoptosis of SMM7721 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血清体积 分数/%	A	抑制率 /%	凋亡指数 /%
对照	-	-	1.87 ± 0.14	-	4.8 ± 2.4
空白	-	20	1.81 ± 0.09	-	4.1 ± 2.3
顺铂 ⁵⁾	5×10^{-4}	20	$0.96 \pm 0.06^{1)}$	47.0	$26.1 \pm 6.9^{1)}$
Cs-4	0.77	20	$1.59 \pm 0.07^{1,2)}$	12.2	$13.9 \pm 2.8^{1,2)}$
	1.54	20	$1.39 \pm 0.13^{1,2,3)}$	23.2	$23.5 \pm 4.0^{1,3)}$
	3.08	20	$1.12 \pm 0.19^{1,2,3,4)}$	38.1	$24.9 \pm 5.5^{1,3)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与顺铂组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 Cs-4 低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$; 与 Cs-4 中剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$; ⁵⁾ 剂量单位为“ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ”(表 2 同)。

3.2 对人肝癌细胞凋亡的影响 对照组和空白组细胞凋亡率无统计学差异; Cs-4 含药血清低、中、高剂量组及顺铂组细胞凋亡率均高于空白组($P < 0.05$); Cs-4 含药血清中、高剂量组凋亡率与 Cs-4 低剂量组有显著差异($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对人肝癌细胞 VEGF, MMP-2 表达的影响 对照组与空白组 VEGF 无统计学差异; Cs-4 含药血清低、中、高剂量组细胞上清液中 VEGF 分别低于空白组($P < 0.05$)。顺铂组细胞上清液 VEGF 浓度明显低于空白组及 Cs-4 发酵菌粉含药血清低、中、高剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

对照组和空白组细胞上清液中 MMP-2 浓度无统计学差异; Cs-4 低、中、高剂量组细胞上清液中 MMP-2 浓度与空白组比较无显著差异; 顺铂组细胞上清液中 MMP-2 浓度低于空白组及 Cs-4 低、中、高剂量组($P < 0.05$)。见表 2。

4 讨论

凋亡受抑和增殖失控是肝癌细胞的重要生理特性, 由于细胞生成增多, 死亡减少, 最终导致肝癌细胞数量迅速增多, 在肝癌患者则表现为病情进展。对肝癌细胞 VEGF, MMP-2 表达的研究同样意义重

表 2 Cs-4 含药血清对 SMMC7721 细胞 VEGF, MMP-2 表达的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of containing Cs-4 serum on Expression of VEGF, MMP-2 of SMMC7721 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	血清体积 /%	VEGF /ng·L ⁻¹	MMP-2 /μg·L ⁻¹
对照	-	-	528.5 ± 56.1	14.8 ± 0.4
空白	-	20	514.5 ± 59.4	14.9 ± 0.8
顺铂 ⁵⁾	5 × 10 ⁻⁴	20	323.4 ± 18.8 ¹⁾	9.1 ± 0.4 ¹⁾
Cs-4	0.77	20	443.5 ± 32.5 ^{1,2)}	14.7 ± 0.7 ²⁾
	1.54	20	436.9 ± 69.3 ^{1,2)}	14.3 ± 0.7 ²⁾
	3.08	20	411.0 ± 32.5 ^{1,2)}	14.2 ± 0.8 ²⁾

大, Folkman^[5]在 1970 年就提出恶性肿瘤根据血管生长情况分期的观点, 此观点认为恶性肿瘤早期时, 肿瘤的状态多处于血管前期, 此期中肿瘤细胞由于无血管运输营养, 不能迅速生长, 瘤体处于增殖抑制状态; 瘤体内出现新生血管的时期被认为肿瘤进入迅速生长并具有转移倾向的血管期, 肿瘤的血管生成被认为与肿瘤发展和转移有密切关系, 针对对肿瘤血管生成的干预治疗被认为是抗肿瘤治疗的新靶点。在肿瘤血管内皮生长过程中, VEGF 家族发挥重要作用^[6]。研究证实 VEGF 可以促进肝癌患者瘤体增大, 使肝癌具有转移倾向^[7]。近期有学者提出肝癌患者的术后转移风险与 VEGF 呈正相关的观点^[8], VEGF 检测还可作为判断肝癌患者预后的指标^[9]。在对接受肝移植手术的肝癌患者的分析中, VEGF 表达水平被证实与肝移植后是否出现肝癌复发有密切关联^[10]。在肿瘤的浸润和转移的过程中, 细胞外基质的降解也是关键一环。MMP-2 可在病理状态下降解细胞外基质, 影响肿瘤细胞的信息传递, 使得肿瘤转移更容易^[11]。MMP-2 表达已被证实与肝癌、食管癌、胃癌、结肠癌多种消化系统恶性肿瘤具有相关性^[12-15]。刘敏证实 MMP-2 检测可用于肝癌的诊断, 指导肝癌患者的治疗, 还可作为判断肝癌患者预后的指标^[16]。陈磊峰则发现 MMP-2 表达下调时, 肝癌的侵袭和转移能力会下降^[17]。

本研究中 Cs-4 对 SMMC-7721 增殖、凋亡影响的结果提示, Cs-4 可能通过影响肝癌细胞增殖、凋亡的生理特性而抑制肝癌患者病情进展。ELISA 结果显示 Cs-4 能抑制人肝癌细胞 VEGF 表达, 提示 Cs-4 可能通过抑制肝癌细胞 VEGF 表达抗肝癌进展, 并具潜在抗肝癌转移作用。Cs-4 对 MMP-2 表达无明显影响。但不同剂量组之间 VEGF 表达量无统计学差异还有待进一步分析和探讨, 为何 Cs-4 对 SMMC-7721 人肝癌细胞 MMP-2 表达无影响, 亦是

值得思考的问题。

[参考文献]

[1] 陈建国. 中国肝癌发病趋势和一级预防[J]. 临床肝胆杂志, 2012, 28(4): 256-260.

[2] 李凤荣. 冬虫夏草的化学成分及药理学研究概况[J]. 内蒙古中医, 2010(17): 102-104.

[3] 漆伟, 雷伟, 严亚波, 等. 冬虫夏草药理作用的研究进展[J]. 环球中医药, 2014, 7(3): 227-232.

[4] 甘娜, 楚瑞阁. 金水宝胶囊联合 GP 方案对非小细胞肺癌患者行为状况的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(12): 68-69.

[5] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.

[6] 苏永强. 血管内皮生长因子及受体在肿瘤发病机制中的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(2): 235-237.

[7] 阮四军, 郭林泉, 周凡. VEGF 与肝脏疾病的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(13): 1191-1196.

[8] 高建芝, 杜经丽, 李佳, 等. VEGF 相关信号通路在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(1): 75-78.

[9] 周晓琳. VEGF-C 蛋白在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(3): 533-534.

[10] 曾纪晓, 夏慧敏, 朱德力, 等. 基质金属蛋白酶-2 和血管内皮生长因子在肝癌肝移植受体的表达和意义[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2013, 34(2): 262-265.

[11] Vijayababu M R, Arunkumar A, Kanagaraj P, et al. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate-194-cancer cells (PC-3)[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 287(2): 109-116.

[12] 赵丹, 龚光伟, 李胜文, 等. MMP2, MMP9 在胃癌中表达的相关性及其与胃癌生物学行为的关系[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(4): 341-343.

[13] 朱涛, 曹虹, 屈淑平. MMP2 和 uPA 在结肠癌组织中的表达及意义[J]. 中国热带医学杂志, 2012, 12(10): 1247-1248.

[14] 赵红莲, 林健, 赵杨, 等. 食管鳞癌中 MMP2 TIMP2 的表达及意义[J]. 河北医学, 2013, 19(12): 1771-1775.

[15] 宋曙, 胥传海, 王振江, 等. 肝细胞肝癌组织中 ET-1, MMP2, CD31 蛋白的表达及意义[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2012, 22(6): 500-506.

[16] 刘敏. 中老年肝癌患者血清中 MMP2, MMP9 和 AFP 表达及其意义[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(1): 171-172.

[17] 陈磊峰, 刘天德, 杜晓红, 等. 原发性肝癌细胞中 Rock2 调控 MMP2 对其侵袭迁移的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(1): 35-39.

[责任编辑 聂淑琴]