

· 药理 ·

## 冬虫夏草蛋白提取物抗 A549 肺癌细胞及免疫活性分析

王玉贤<sup>1</sup>, 王艺璇<sup>1</sup>, 陈蓉<sup>1</sup>, 万德光<sup>1</sup>, 彭成<sup>1</sup>, 沈才洪<sup>2</sup>, 童芯铤<sup>1\*</sup>, 国锦琳<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 2. 泸州老窖博士后科研工作站, 四川 泸州 646606)

**[摘要]** 目的:观察冬虫夏草蛋白提取物(OSPE)对肺癌细胞 A549 的抑制作用,研究其对免疫功能的影响。方法:以 OSPE 低、中、高质量浓度(100,200,500 mg·L<sup>-1</sup>)处理 A549 细胞 24 h;以 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 分别处理 A549 细胞 12,24,48,72 h 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力;Hoechst 33258 染色和流式细胞术检测细胞凋亡;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)mRNA 表达。利用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,检测不同质量浓度 OSPE 对巨噬细胞分泌的肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-12(IL-12)的影响。结果:OSPE 具有明显抑制 A549 细胞活力的作用,OSPE(100,200,500 mg·L<sup>-1</sup>)组抑制率分别为 19.29%,58.70%,94.91%;200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 处理 A549 细胞(12~72 h),抑制率呈时间依赖性;Hoechst 染色后,细胞呈现典型的凋亡形态变化,流式细胞检测凋亡率显示,200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 呈现时间依赖性地增加 A549 细胞凋亡率( $P < 0.01$ );Real-time PCR 结果显示 OSPE 明显上调 Bax mRNA 表达量,Bcl-2/Bax 显著减小( $P < 0.01$ )。ELISA 检测结果显示,OSPE 对正常巨噬细胞 TNF-α,IL-1,IL-12 具有显著促进分泌作用( $P < 0.01$ )。结论:OSPE 可通过上调 Bax 诱导凋亡,抑制 A549 细胞增殖;也可促进正常巨噬细胞分泌因子 TNF-α,IL-1,IL-12 的分泌,推测 OSPE 可通过诱导凋亡和激活免疫 2 种方式抑制肿瘤。

**[关键词]** 冬虫夏草蛋白提取物; 癌细胞; 凋亡; 巨噬细胞分泌因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0079-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010079

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1117.048.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-26 11:17

### Effect of Protein Extracts of Cordyceps on Growth of A549 Cells and Immune Activity of Mouse Peritoneal Macrophages *in Vitro*

WANG Yu-xian<sup>1</sup>, WANG Yi-xuan<sup>1</sup>, CHEN Rong<sup>1</sup>, WAN De-guang<sup>1</sup>,  
PENG Cheng<sup>1</sup>, SHEN Cai-hong<sup>2</sup>, TONG Xin-xin<sup>1\*</sup>, GUO Jin-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of TCM, State Key Laboratory Breeding Base of System Research and Development and Utilization of TCM, Chengdu 611137, China; 2. LuzhouLaojiao Postdoctoral Station, Luzhou 646606, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Cordyceps protein extract (OSPE) on the growth of A549 lung cancer cells and immune activity of mouse peritoneal macrophage *in vitro*. **Method:** A549 cells were treated with low, medium, and high concentrations (100, 200, 500 mg·L<sup>-1</sup>) OSPE for 24 h, and 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE was used to treat A549 cells for 12, 24, 48, 72 h, respectively. Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method; cell apoptosis and necrosis were evaluated by Hoechst 33258 staining and flow

**[收稿日期]** 20170614(020)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373920,30801522);四川省中医药科学技术研究专项(2016Q056);成都市科技计划项目(2015-HM01-00205-SF)

**[第一作者]** 王玉贤, 硕士, 从事生药学研究, Tel:13540650240, E-mail:2914875409@qq.com

**[通信作者]** \* 国锦琳, 博士, 教授, 从事名贵中药资源与鉴定研究方向, Tel:13981938406, E-mail:guo596@163.com;

\* 童芯铤, 博士, 讲师, 从事中药资源与鉴定研究方向, Tel:13708170692, E-mail:1842161947@qq.com

cytometry. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of Bcl-2 associated X protein (Bax) and B cell leukemia 2 (Bcl-2). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was optimized to detect the effect of OSPE on macrophage secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-12 (IL-12) levels. **Result:** The (100, 200, 500 mg·L<sup>-1</sup>) OSPE remarkably inhibited the A549 cell growth with an inhibitory rate of 19.29%, 58.70% and 94.91% respectively, and 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE (12-72 h) decreased significantly cell growth by increasing apoptosis in a time dependent manner. After Hoechst staining, the cells showed typical morphological changes of apoptosis, and the flow cytometry results showed that 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE increased the apoptosis of A549 cells in a time dependent manner ( $P < 0.01$ ). Real-time PCR results showed that OSPE significantly increased Bax mRNA expression and significantly decreased Bcl-2/Bax expression ( $P < 0.01$ ). The results of ELISA showed that OSPE significantly promoted TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-12 levels in normal macrophages ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** OSPE inhibited the growth of A549 cells by inducing apoptosis, also probably by promoting the secretion of the macrophage secretion factors.

[ **Key words** ] Cordyceps protein extract; tumor cell; apoptosis; macrophage factors

冬虫夏草是麦角菌科真菌冬虫夏草菌寄生于蝙蝠蛾科昆虫幼虫上形成的子座和幼虫尸体的干燥复合体<sup>[1]</sup>,主要分布于西藏、青海、四川、云南等高海拔高寒地区<sup>[2]</sup>,具有补肾益肺、化痰止血的功效<sup>[3]</sup>。现代研究表明冬虫夏草具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化等药理作用<sup>[4-7]</sup>。冬虫夏草菌丝体乙醇提取液对体外培养的肝癌细胞 HepG2 和肺癌细胞 NCI-H460 有明显的抑制作用<sup>[8]</sup>,人工培养的冬虫夏草多糖提取物 60 mg·kg<sup>-1</sup> 能显著地增强该小鼠腹膜巨噬细胞的吞噬能力,促进脾淋巴细胞的增殖,能显著地抑制黑素瘤 B16 细胞向肝肺转移,具有免疫调节和抗肿瘤活性<sup>[9]</sup>。冬虫夏草蛋白质质量分数 29.1% ~ 33%,是冬虫夏草中含量最丰富的化学成分。但目前对冬虫夏草抗肿瘤及免疫研究主要集中在多糖、腺苷等成分上,对含量丰富的蛋白肽类研究甚少。

课题组前期研究发现冬虫夏草蛋白提取物具有明显的抗肿瘤作用,本实验对冬虫夏草蛋白提取物进行抑制肿瘤细胞机制研究,为冬虫夏草蛋白类组分的功能研究提供依据,为后续冬虫夏草质量评价的生物标记物(指标性成分)的寻找与功能性成分的开发奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物和细胞株** SPF 级昆明种小鼠,购自成都达硕生物科技有限公司,合格证号 SCXK(川)2008-0024。实验过程中对小鼠处理符合成都中医药大学实验动物伦理会标准,批号成中医实(2016)16 号。人肺腺癌细胞 A549 由成都中医药大学基础医学院提供。

**1.2 药物与试剂** 冬虫夏草于 2015 年 5 月采集自四川省康定县雅家埂,由成都中医药大学国锦琳教

授鉴定为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 寄生于蝙蝠蛾科昆虫幼虫上形成的子座和幼虫尸体的干燥复合体,药材低温干燥后密封,于 4 ℃ 冰箱保存,均符合 2015 年版《中国药典》一部要求。

DMEM 高糖培养基, RPMI 1640 培养基,特级胎牛血清,青霉素-链霉素(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30022.01B, SH30809.01B, SH30070.01, SV30010); 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒,二甲基亚砜 (DMSO),红细胞裂解液(美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, D4540, R7757); 蛋白质相对分子质量标准 Marker (天根生化科技有限公司,批号 MP102); Hoechst 33258 染色试剂盒(北京雷根生物技术公司,批号 DA0032); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号 CA1020-20T); trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-018); 逆转录试剂盒(日本 Takara 公司,批号 RR047A); SYBR RT-PCR mix(康为世纪有限公司,批号 CW0957S); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-1 (IL-1), 白细胞介素-12 (IL-12) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒(上海 Lengton Bioscience 公司,批号分别为 BPE20220, BPE20009, BPE20750)。

引物由北京擎科新业生物技术有限公司设计合成, B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2, 180 bp): 上游 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC-3', 下游 5'-CCTCAGCCCAGACTCACATC-3'; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax, 178 bp): 上游 5'-AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAG-3', 下游 5'-CAAAGTAGAAAAGGGCGAAC-3'; 人  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 205 bp): 上游 5'-

AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3', 下游 5'-GGGCAC GAAGGCTCATCATT-3'。

**1.3 仪器** X-22R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);UV1800PC 型紫外分光光度计(上海美普达仪器有限公司);Mini-PROTEAN 型电泳、转模系统(美国 Bio-Rad 公司);Varioskan 型酶标仪(美国 Thermo 公司);NanoDrop 2000 型微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司);Navios 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);CFX Connex<sup>TM</sup> 型定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),DMI3000B 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 冬虫夏草蛋白提取物(OSPE)制备及鉴定** 称取冬虫夏草药材子实体 0.6 g,剪碎、置预冷研钵中,加入适量液氮迅速研磨成细粉,称量粉末 0.5 g,加入 4 ℃ 预冷的蛋白提取液 5 mL,研磨至匀浆,置于 4 ℃ 冰箱浸提过夜,4 ℃,9 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,3 次,移去上层脂质,弃掉底部残渣,取上清液,即得冬虫夏草总蛋白提取液<sup>[10]</sup>,通过 Bradford 法<sup>[11]</sup> 测定蛋白浓度。配置 6% 分离胶,6% 浓缩胶,120 V 进行 SDS-PAGE 电泳,经固定、染色、脱色,蛋白凝胶成像分析<sup>[10]</sup>。

**2.2 MTT 比色法检测细胞活力** A549 细胞常规培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液,取对数生长期细胞,按照 1 × 10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔接种 200 μL,培养 24 h 后每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h,弃去原有培养基,每孔加入 DMSO 150 μL,室温下震荡 15 min,调节 Varioskan 酶联检测仪波长为 490 nm 检测其吸光度 A,实验重复 3 次,根据 A 计算细胞抑制率,细胞抑制率 = 1 - (A<sub>实验孔</sub> - A<sub>溶剂孔</sub>) / (A<sub>空白孔</sub> - A<sub>溶剂孔</sub>)。设溶剂组为 DMEM 培养基,OSPE (100, 200, 500 mg·L<sup>-1</sup>) 组,不加蛋白提取物设为空白组,每 1 个质量浓度设 5 个复孔。按 200 mg·L<sup>-1</sup> 蛋白提取物分别处理细胞 (12, 24, 48, 72 h) 进行时间梯度实验。

## 2.3 凋亡检测

**2.3.1 Hoechst 33258 染色技术检测凋亡** 取对数生长期细胞,按 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种 6 孔板,培养过夜,200 mg·L<sup>-1</sup> 蛋白提取物分别处理 12, 24, 48 h,溶剂组为 DMEM 培养基,每组设 3 个复孔,按照 Hoechst 33258 试剂盒说明书操作,于倒置荧光显微镜下观察并照相。

**2.3.2 Annexin V/PI 双染测定细胞凋亡率** 细胞前处理同 2.3.1 项,细胞用预冷的磷酸盐缓冲液

(PBS)洗涤 2 次,收集贴壁细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光反应 15 min,流式细胞仪检测和分析,按照 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作。通过 Annexin V-FITC 阳性和 PI 阴性 (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) 象限细胞群来评估凋亡率并用 CXP 软件分析数据<sup>[12]</sup>。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 Bcl-2, Bax mRNA 表达** 取对数生长期细胞,按 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种 6 孔板,培养过夜,200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 分别处理 24, 48 h, PBS 洗 2 次, trizol 裂解液法提取细胞总 RNA, 溶剂组为 DMEM 培养基。采用分光光度计以及 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 确保 RNA 样品质量浓度 ≥ 400 mg·L<sup>-1</sup>, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8。取 RNA 2 μg 加入逆转录体系, 反应条件为 30 ℃ 10 min, 42 ℃ 30 min, 95 ℃ 5 min, 4 ℃ 5 min。以 cDNA 模板为模版, 以人 β-actin 为内参, 进行 PCR 反应, 反应体系: 2 × UltraSYBR Mixture 12.5 μL, 上下引物各 0.5 μL, cDNA 模板 10 ng, 双蒸水补足至 25 μL。反应条件: 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 32 s, 39 个循环。实验设 5 个重复, 用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析数据。

**2.5 ELISA 法检测巨噬细胞分泌因子 TNF-α, IF-1, IF-12 含量**

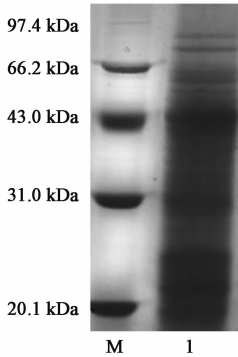
**2.5.1 小鼠腹腔巨噬细胞的收集及培养** 按照张淑莉等<sup>[13]</sup> 方法收集小鼠腹腔巨噬细胞, 将回收的灌洗液, 以 1 000 × g 离心 10 min, 弃上清收集, 加入 PBS (pH 7.2, 0.02 mol·L<sup>-1</sup>) 溶解, 加入红细胞裂解液, 避光、静置 10 min, 1 000 × g 离心 10 min。加入 RPMI 1640 1 mL 溶解细胞, 并接种于 96 孔板中, 培养 3 h 后, 去培养液, PBS 洗 3 次, 贴壁细胞即为单层腹腔巨噬细胞。

**2.5.2 分组、给药及 TNF-α, IL-1, IL-12 含量测定** 实验分为 2 个组, 每组 3 个复孔, 溶剂组为 PBS 溶剂, 给药组采用 25, 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 处理。细胞培养 6 h 后给药, 反应 9 h 后终止给药, 更换双无培养基 (不含血清和药物), 36 h 后离心取出上清液即得待测样品。按照 ELISA 试剂盒说明书方法分别测定样品中 TNF-α, IL-1, IL-12 含量, 设空白孔, 对照品孔及待测样品孔, 按照试剂盒说明书绘制标准曲线。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 所有数据均表示为  $\bar{x} \pm s$ , 两组之间比较采用 LSD 法, 3 组以上的数据采用 One Way ANOVA, P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 OSPE 质量均一性评价** 经 Bradford 法测定所提取的冬虫夏草粗蛋白百分体积为 2.0% ~ 3.0%, 统一配置到 2.0% OSPE 标准化提取物, SDS-PAGE 电泳表明蛋白主要分布在 20 ~ 43 kDa。见图 1。



M. 蛋白预染 Marker; 1. OSPE

图 1 OSPE SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE map of OSPE

**3.2 OSPE 对 A549 细胞活力的影响** 与溶剂组比较, OSPE (100, 200, 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 A549 细胞 24 h, 药物组细胞增殖抑制率明显增加 ( $P < 0.05$ ), 且呈一定范围剂量依赖性, 见表 1。进一步选择 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE 开展抗肿瘤机制研究, 分别处理相应时间, 与溶剂组比较, 药物组细胞抑制率显著增加 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间依赖性, 见表 2。因此, OSPE 抑制 A549 细胞活力呈浓度和时间依赖性。

表 1 OSPE 对 A549 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of OSPE on proliferation of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 24 h 抑制率/%                     |
|------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 溶剂   | -                                     | 0                              |
| OSPE | 500                                   | 94.91 $\pm$ 0.98 <sup>1)</sup> |
|      | 200                                   | 58.70 $\pm$ 2.64 <sup>1)</sup> |
|      | 100                                   | 19.29 $\pm$ 2.06 <sup>1)</sup> |

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

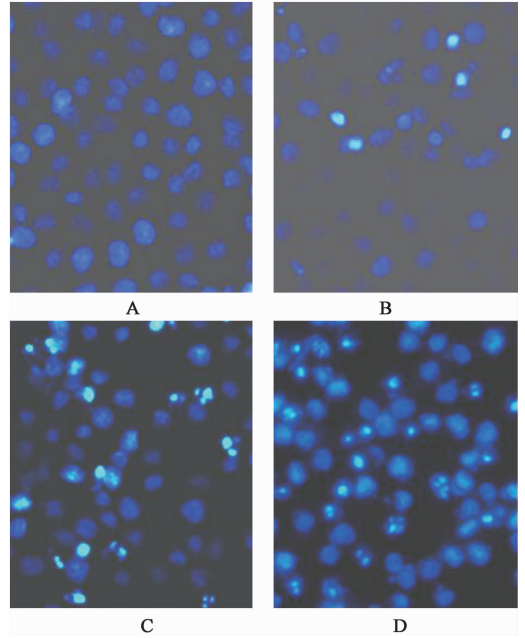
表 2 OSPE 不同处理时间对 A549 细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of OSPE on proliferation of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | %                              |                                |                                |                                |
|------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|      |                                       | 12 h                           | 24 h                           | 48 h                           | 72 h                           |
| 溶剂   | -                                     | 0                              | 0                              | 0                              | 0                              |
| OSPE | 200                                   | 30.48 $\pm$ 2.95 <sup>1)</sup> | 58.70 $\pm$ 2.64 <sup>1)</sup> | 80.48 $\pm$ 3.79 <sup>1)</sup> | 89.89 $\pm$ 0.44 <sup>1)</sup> |

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 OSPE 对 A549 细胞凋亡的影响** Hoechst33258 染色后, 溶剂组细胞染色后呈均匀暗浅蓝色, 细胞边缘光滑, 形态完整, 呈现圆形或椭圆形; 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE 处理 12 h 后, 细胞质开始浓聚、胞核固缩变小, 细胞边缘不规整, 呈现白色亮点, 时间延长至 24 h, 观察到大量肿胀漂浮细胞, 及细胞碎片, 是明显的细胞凋亡解体所致。见图 2。



A. 空白组; B ~ D. OSPE 12, 18, 24 h 组

图 2 OSPE 对 A549 细胞凋亡的影响 (Hoechst33258,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of OSPE on apoptosis of A549 cells (Hoechst33258,  $\times 400$ )

Annexin V-FITC/PI 染色, 流式检测显示, 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE 分别处理 12, 24, 48 h, 早期凋亡率分别为 (11.2  $\pm$  0.44)%, (25.5  $\pm$  3.8)%, (53.3  $\pm$  0.98)%. 与溶剂组比较, OSPE 分别处理 24, 48 h 时细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ ), 且组间差异显著 ( $P < 0.01$ ), 显示 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE 可明显诱导 A549 细胞凋亡, 具时间依赖性。见表 3。

表 3 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE 对 A549 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  OSPE on apoptosis ratio of A549 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 时间/h | 凋亡率/%                              |
|------|------|------------------------------------|
| 溶剂   | -    | 4.47 $\pm$ 1.24                    |
| OSPE | 12   | 10.53 $\pm$ 0.44                   |
|      | 24   | 23.61 $\pm$ 3.8 <sup>1,2)</sup>    |
|      | 48   | 54.76 $\pm$ 0.98 <sup>1,3,4)</sup> |

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 OSPE 作用 12 h 比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 OSPE 作用 24 h 比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.4 OSPE 对 A549 细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响** 与溶剂组比较, OSPE 作用 24, 48 h 细胞内 Bax mRNA 相对表达量显著增加 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**表 4 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 对 A549 细胞 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**Table 4 Effect of 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE on Bax and Bcl-2 mRNA expression levels in A549 cells** ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 时间/h | Bax                       | Bcl-2       | Bcl-2/Bax          |
|------|------|---------------------------|-------------|--------------------|
| 溶剂   | -    | 1.00 ± 0.18               | 1.00 ± 0.14 | 1                  |
| OSPE | 24   | 2.50 ± 0.50 <sup>2)</sup> | 1.12 ± 0.51 | 0.45 <sup>1)</sup> |
|      | 48   | 8.16 ± 0.70 <sup>2)</sup> | 3.73 ± 0.20 | 0.46 <sup>1)</sup> |

注:与溶剂组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 5 同)。

**3.5 OSPE 对巨噬细胞分泌因子 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 的影响** 与溶剂组比较, OSPE 25 ~ 200 mg·L<sup>-1</sup> 组巨噬细胞分泌因子 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 含量明显增加 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性。见表 5。

**表 5 OSPE 对巨噬细胞分泌因子 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 含量的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**Table 5 Effect of OSPE on macrophage factors TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-12** ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
ng·L<sup>-1</sup>

| 组别   | 质量浓度/mg·L <sup>-1</sup> | TNF- $\alpha$               | IL-1                        | IL-2                      |
|------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 溶剂   | -                       | 154.00 ± 0.13               | 146.00 ± 0.13               | 3.30 ± 0.23               |
| OSPE | 25                      | 166.00 ± 0.11 <sup>1)</sup> | 177.00 ± 0.12 <sup>1)</sup> | 4.72 ± 0.10 <sup>1)</sup> |
|      | 50                      | 171.00 ± 0.12 <sup>1)</sup> | 174.00 ± 0.15 <sup>1)</sup> | 4.27 ± 0.15 <sup>1)</sup> |
|      | 100                     | 178.00 ± 0.11 <sup>1)</sup> | 177.00 ± 0.13 <sup>1)</sup> | 4.56 ± 0.12 <sup>1)</sup> |
|      | 150                     | 185.00 ± 0.12 <sup>1)</sup> | 182.00 ± 0.14 <sup>1)</sup> | 4.81 ± 0.13 <sup>1)</sup> |
|      | 200                     | 190.00 ± 0.18 <sup>2)</sup> | 178.00 ± 0.17 <sup>1)</sup> | 4.50 ± 0.17 <sup>1)</sup> |

#### 4 讨论

国内外大量研究已证实冬虫夏草具有良好的抗肿瘤活性和免疫活性, 而对其含量最高的蛋白质类成分的抗肿瘤活性研究少见报道, 本实验结果显示, OSPE 对 A549 肺癌细胞增殖具有显著抑制效应, 具有浓度和时间依赖性。细胞形态结果显示药物组细胞呈现典型的凋亡形态特征。流式技术检测凋亡率, 与溶剂组比较, 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 处理 24, 48 h 后细胞凋亡率显著增加, 表明 OSPE 可能通过诱导凋亡, 抑制 A549 肺癌细胞增殖, 且具时间依赖性。

Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中发挥重要作用, Bcl-2 是主要的抗凋亡基因, Bax 是 Bcl-2 的拮抗因子, 具有促进凋亡的作用, Bcl-2/Bax 表达是决定细胞是否进入凋亡状态以及凋亡作用强弱的关键因

素<sup>[14-15]</sup>。本实验发现 Bax mRNA 表达量上升, Bcl-2/Bax 降低, 表明 OSPE 可能通过上调 Bax 表达诱导凋亡。

相关研究表明临床也在利用凋亡机制实现靶向性诱导凋亡来治疗肿瘤<sup>[16-17]</sup>。本研究发现 200 mg·L<sup>-1</sup> OSPE 处理 24 h 后, A549 细胞生长抑制率达 58.7%, 但是凋亡率约 25.5%, 推测 OSPE 抑制肿瘤细胞增殖除了诱导凋亡外, 还可能其他机制发挥抗肿瘤效应。

体外研究表明 TNF- $\alpha$  可直接杀伤肿瘤细胞, 如肺癌、黑色素瘤、乳腺癌及宫颈癌细胞等<sup>[18-19]</sup>, 大量研究已表明炎症细胞因子 (IL-1, IL-12, IL-17 等) 与肿瘤的发生、发展关系密切, 发挥抑制肿瘤细胞增殖作用<sup>[20]</sup>。本实验发现冬虫夏草 OSPE 可促进正常巨噬细胞分泌因子 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 增加, 推测 OSPE 也可能通过调节炎症因子抗肿瘤。

综上, OSPE 抑制 A549 肺癌细胞的生物学机制可能通过上调 Bax 表达, 诱导肿瘤细胞凋亡, 促进巨噬细胞分泌因子 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12 分泌, 从而激发免疫效应抑制肿瘤细胞活力两种方式起作用。下一步研究, 将对 OSPE 进行分离鉴定, 寻找其中发挥抑制肿瘤细胞功能的活性蛋白质或多肽, 为冬虫夏草质量控制和新药开发奠定基础。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 115-116.

[2] 陈璐, 万德光, 国锦琳. 冬虫夏草的本草新考[J]. 吉林中医药, 2014, 34(10): 1022-1023.

[3] 向丽. 冬虫夏草保护生物学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.

[4] 张博华, 陈晶. 冬虫夏草药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2012, 29(1): 134-135.

[5] XU J, HUANG Y, CHEN X, et al. Activities of *Ophiocordyceps sinensis* Fungi[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 30(10): 1572-1583.

[6] QIAN G, PAN G F, GUO J Y. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* [J]. Nat Prod Res, 2012, 26(24): 2358-2362.

[7] WU D T, MENG L Z, WANG L Y, et al. Chain conformation and immunomodulatory activity of a hyperbranched polysaccharide from *Cordyceps sinensis* [J]. Carbohydr Polym, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.044.

[8] 陈家念, 张璇, 蔡豪斌, 等. 冬虫夏草菌丝体水提醇沉

- 物体外抗肿瘤活性研究[J]. 药物评价研究, 2014, 37(2):108-112.
- [9] 钟建春, 张艳, 丁振涛, 等. 人工冬虫夏草多糖提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(6):100-102.
- [10] 任艳. 名贵中药冬虫夏草品种及蛋白组分研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [11] John M W. *The Protein Protocols handbook* [M]. New York: United States: Human Press, 2001:17-24.
- [12] 刘飒, 崔巍, 王晓波, 等. 流式细胞术检测细胞周期分析软件比较[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(11):870-873.
- [13] 张淑莉, 张琪, 景晓红. 小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2):174-178.
- [14] CONG H L, DU N, YANG Y, et al. Enterovirus 712B induces cell apoptosis by directly inducing the conformational activation of the pro-apoptotic protein Bax [J]. *J Virol*, 2016, 90(21):9862-9877.
- [15] Llambi F, WANG Y M, Victor B, et al. BOK is a non-canonical Bcl-2 family effector of apoptosis regulated by ER-associated degradation [J]. *Cell*, 2016, 165(2):421-433.
- [16] Kapoor V, Aggarwal S, Das S. 6-Gingerol mediates its anti tumor activities in human oral and cervical cancer cell lines through apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(4):588-595.
- [17] John C R. Dysregulation of apoptosis in cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 17(9):2941-2953.
- [18] Burton E R, Libutti S K. Targeting TNF- $\alpha$  for cancer therapy [J]. *J Biol*, 2009, 8(9):85-90.
- [19] CHEN Y F, ZOU Z Y, WU Z M, et al. TNF- $\alpha$ -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia [J]. *Expert Rev Hematol*, 2015, 8(4):515-526.
- [20] Lasek W, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? [J]. *Cancer Immunol Immun*, 2014, 63(5):419-435.

[责任编辑 张丰丰]