

灵芝多糖调控PI3K/Akt信号通路抑制肝癌细胞恶性表型

沈瑞, 徐静, 王雷, 蔡标, 宋航*
(安徽中医药大学, 合肥 230012)

[摘要] 目的:观察灵芝多糖对肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7增殖、迁移、细胞周期及凋亡的影响,同时探讨其可能的作用机制。方法:将肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7作为主要研究对象,设立空白组和灵芝多糖低、中、高组(3.5、7、14 g·L⁻¹)。细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测灵芝多糖对肝癌细胞增殖能力的影响;划痕实验检测灵芝多糖对肝癌细胞迁移能力的影响;流式细胞术测定灵芝多糖对肝癌细胞周期的影响;Hoechst33258染色法测定灵芝多糖对肝癌细胞凋亡的影响,通过蛋白免疫印迹法检测灵芝多糖对肝癌细胞磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化Akt(p-Akt)蛋白表达水平的影响。结果:与空白组比较,灵芝多糖低、中、高组SK-HEP-1和Huh-7细胞增殖和迁移能力降低($P<0.05$);灵芝多糖低、中、高组G₁期细胞比例升高($P<0.05$),S期和G₂期细胞比例降低($P<0.05$);灵芝多糖低、中、高组可以诱导2种肝癌细胞凋亡,并且药物浓度越高作用越明显。与空白组比较,灵芝多糖低、中、高组PI3K和Akt的磷酸化水平降低($P<0.05$)。结论:灵芝多糖对肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7的恶性表型有显著抑制作用,其作用机制与PI3K/Akt信号通路有关。

[关键词] 灵芝多糖; 肝癌; 细胞实验; 恶性表型; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B (PI3K/Akt) 信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)06-0088-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2022002023

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220817.1023.003.html>

[网络出版日期] 2022-08-18 12:45:04

Ganoderma lucidum Polysaccharides Inhibit Malignant Phenotype of Hepatocellular Carcinoma Cells by Regulating PI3K/Akt Signaling Pathway

SHEN Rui, XU Jing, WANG Lei, CAI Biao, SONG Hang*
(Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLP) on the proliferation, migration, cycle, and apoptosis of hepatocellular carcinoma SK-HEP-1 and Huh-7 cells and to explore the underlying mechanism. **Method:** SK-HEP-1 and Huh-7 cells were classified into the blank group and low-, medium-, and high-dose GLP groups (3.5, 7, 14 g·L⁻¹). The proliferation of the cells was examined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the migration by scratch assay. Cell cycle was measured by flow cytometry and apoptosis was detected based on Hoechst33258 staining. In addition, the expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated PI3K (p-PI3K), and phosphorylated Akt (p-Akt) in the cells was determined by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the three doses of GLP reduced the proliferation and migration of SK-HEP-1 and Huh-7 cells ($P<0.05$), increased the percentage of cells in G₁ phase ($P<0.05$), and decreased percentage of cells in S and G₂ phase ($P<0.05$). In addition, the three doses can induce apoptosis of both SK-HEP-1 and Huh-7 cells, particularly the high dose. Moreover, the three doses of GLP lowered the levels of p-PI3K and p-Akt ($P<0.05$). **Conclusion:** GLP

[收稿日期] 2022-03-29

[基金项目] 安徽中医药大学人才支持计划(重大)项目(2019rcZD001);青年皖江学者支持计划项目;安徽省自然科学基金项目(2108085Y29);癌症转化医学安徽省重点实验室(蚌埠医学院)项目(KFZZ202205)

[第一作者] 沈瑞,在读硕士,从事中医药防治肿瘤研究,E-mail: shenrui28256@163.com

[通信作者] *宋航,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治肿瘤研究,E-mail: hangsong@ahtcm.edu.cn

significantly inhibited the malignant phenotype of SK-HEP-1 and Huh-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] *Ganoderma lucidum* polysaccharides; liver cancer; cell experiment; malignant phenotype; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

肝癌是一种高发病率、高死亡率的恶性肿瘤。手术治疗是早期肝癌患者最普遍和最有效的治疗手段,晚期患者通常需要接受全身治疗,但治疗效果往往并不理想^[1]。索拉非尼和乐伐替尼是2种晚期肝癌的一线治疗药物。索拉非尼可以有效抑制肝癌细胞的恶性表型,但在治疗过程中肿瘤细胞很容易对其产生耐药性,并且伴发多种不良反应。乐伐替尼在临床试验中的治疗表现不差于索拉非尼,但其仍缺乏完整的治疗方案^[2-3]。在探求新的治疗手段时,药食中的天然化合物被发现具有良好的治疗潜力^[4]。天然化合物毒性低、不良反应小,并且治疗范围十分广泛,涉及抗氧化、抗炎和抗癌等多个方面的疗效^[5]。灵芝是中国传统著名药食两用真菌,有“仙草”之称。灵芝的子实体和孢子粉都具有多种药用价值,其在抗肿瘤方面的良好疗效已经得到证实^[6-7]。灵芝多糖是灵芝中的重要活性物质,也是灵芝发挥抗癌作用的主要成分。研究表明灵芝多糖可以抑制结直肠癌的发生^[8]、调节巨噬细胞极化和微环境来抑制肝癌细胞活性^[9]以及抑制信号分子磷酸化来干预肺癌细胞转移^[10]。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路是癌症中常见的异常激活通路,管理细胞存活、细胞周期进程和细胞生长等多种生物过程^[11]。本研究通过灵芝多糖对肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7恶性表型的影响,以及灵芝多糖对PI3K/Akt信号通路的调控作用,进一步探讨其抗癌机制。

1 材料

1.1 细胞与试剂 人肝癌细胞系SK-HEP-1和Huh-7(美国ATCC公司,批号分别为HTB-52、YB-H3110),置于含有10%胎牛新鲜血清的DMEM高糖培养基,在37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养,传至第5代后用于实验。破壁灵芝孢子粉(安徽敬道生物科技有限公司,批号200301),经安徽中医药大学药学院俞年军教授鉴定符合实验要求,为多孔菌科植物灵芝*Ganoderma lucidum*的孢子粉;胎牛血清(以色列Biological Industries公司,批号04-001-1A);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(美国Glpbio公司,批号GK10001);cell cycle staining kit(杭州联科生物技术有限公司,批号

CCS102);Hoechst33258、RIPA蛋白质裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、ECL显影试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C1011、P0013C、P0012S、P0018S);TBS+Tween(TBST)缓冲液(中国Biosharp公司,批号21259419);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、磷酸化(p)-PI3K、蛋白激酶B(Akt)、p-Akt抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为2118S、4257T、4228T、4691T、4063T);辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(中国北京索莱宝科技有限公司,批号SE134)。

1.2 仪器 HF160W型恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司);318C+型酶标仪(上海赣闽分析仪器有限公司);DMi8型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);NovoCyte 2060R型流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司];1645070型电泳仪(美国Bio-Rad公司);Tanon 5200型FluorChem M凝胶成像仪(美国Protein Simple公司)。

2 方法

2.1 制备灵芝多糖 参照文献[12]方法制备灵芝多糖。称取适量的破壁灵芝孢子粉,先用乙醇浸泡进行粗提取,再将提取物溶解于超纯水100 mL,然后依次用5、1.2、0.45 μm的微滤膜进行过滤,除去灵芝多糖粗提液中的固形物。在超滤压力为0.43 mPa,溶液温度为35℃,膜面流速为15.5 m·s⁻¹条件下,用1×10⁴ Da的超滤膜分离特定区间相对分子质量的灵芝多糖,最后进行真空冷冻干燥处理,得到后续实验的灵芝多糖,由此制得的破壁灵芝孢子粉多糖得率为15.56 mg·g⁻¹,纯度为82.4%。

2.2 CCK-8法检测细胞增殖 肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7消化后,1 200 r·min⁻¹离心3 min(离心半径10 cm)收集细胞,将细胞密度调到4×10⁴个/mL,以每孔100 μL均匀接种在96孔板中。将96孔板于37℃、5% CO₂恒温培养箱中过夜培养,直至细胞完全贴壁。用DMEM完全培养基配制不同浓度(0、2、4、8、16、32 g·L⁻¹)的灵芝多糖溶液,每个浓度设置3个复孔,在吸除原有培养基后加入灵芝多糖溶液培养细胞48 h。之后在复孔中以DMEM基础培养基-CCK-8 10:1加入CCK-8试剂,培养箱孵育2 h,

用酶标仪测量450 nm处A,计算肝癌细胞存活率。
增殖抑制率=($A_{\text{溶剂孔}} - A_{\text{药物组}}$)/($A_{\text{溶剂孔}} - A_{\text{空白组}}$) $\times 100\%$,
细胞存活率=($A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}$)/($A_{\text{溶剂孔}} - A_{\text{空白组}}$) $\times 100\%$ 。

2.3 检测细胞划痕愈合 肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7消化后,将细胞密度调到 8×10^4 个/mL,以每孔500 μL 均匀接种在24孔板中。待板中细胞长到90%时,用10 μL 的白枪头在孔内划线,用磷酸盐缓冲液(PBS)轻柔漂洗2次,洗去脱落的细胞后加入DMEM基础培养基配制的0、3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 灵芝多糖溶液,并在作用0、48 h时进行拍照记录。计算划痕愈合的相对距离进行统计学分析。

2.4 检测细胞周期 肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7消化,将细胞密度调至 1×10^6 个/mL,以每孔2 mL均匀接种在6孔板中。待细胞贴壁后加入0、3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 灵芝多糖溶液,培养48 h分别收集孔中的细胞,弃上清。用预冷PBS清洗,加入DNA Staining solution 1 mL和碘化丙啶(PI) 10 μL ,并涡旋振荡混匀,于室温避光孵育30 min,用流式细胞仪进行检测。

2.5 检测细胞凋亡 肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7消化后,将细胞密度调到 8×10^4 个/mL,以每孔500 μL 均匀接种在24孔板中。待细胞贴壁后,用DMEM完全培养基配制0、3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 灵芝多糖溶液培养细胞48 h,每个浓度设置2个复孔。培养过后用4%多聚甲醛进行细胞固定20 min,用PBS漂洗2次,每次5 min。将细胞用Hoechst33258染液避光孵育约5 min,用PBS漂洗。用荧光显微镜观察凋亡细胞的形态变化并拍照。

2.6 蛋白免疫印迹法检测细胞蛋白表达 肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7消化后,将细胞密度调至 1×10^6 个/mL,以每孔2 mL均匀接种在6孔板中。待细胞贴壁后,用DMEM完全培养基配制0、3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 灵芝多糖溶液培养细胞72 h, PBS漂洗细胞,用细胞裂解液裂解细胞并收集。蛋白上样后进行电泳和转膜,封闭2 h后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,将PVDF膜放入一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。用TBST缓冲液漂洗3遍后,在室温下孵育二抗(1:5 000) 2 h,再用TBST缓冲液漂洗,最后在PVDF膜上滴上显影液进行曝光。

2.7 统计学方法 采用GraphPad Prism 8.0和SPSS 26.0软件进行统计分析,所有符合正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有检验皆为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灵芝多糖对肝癌细胞增殖能力的影响 与空白组比较,灵芝多糖($4 \sim 32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于SK-HEP-1和Huh-7细胞时,细胞的活力均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。灵芝多糖作用于SK-HEP-1和Huh-7细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为7 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,根据 IC_{50} 的一半和两倍确定灵芝多糖3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 用于后续实验。与空白组比较,灵芝多糖组(3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)均可以抑制肝癌细胞的增殖($P < 0.01$),其抑制程度和灵芝多糖浓度成正比。见表1、表2。

表1 灵芝多糖对肝癌细胞的存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on survival rate of hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	
		SK-HEP-1	Huh-7
空白组		100.00 \pm 1.43	100.00 \pm 0.65
灵芝多糖组	2	86.90 \pm 2.43	90.76 \pm 1.36
	4	75.83 \pm 1.70 ¹⁾	81.19 \pm 1.93 ¹⁾
	8	61.44 \pm 1.71 ²⁾	63.53 \pm 1.00 ²⁾
	16	44.74 \pm 1.56 ²⁾	48.43 \pm 1.36 ²⁾
	32	29.19 \pm 0.65 ²⁾	33.83 \pm 1.12 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2-表5同)

表2 灵芝多糖对肝癌细胞的存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

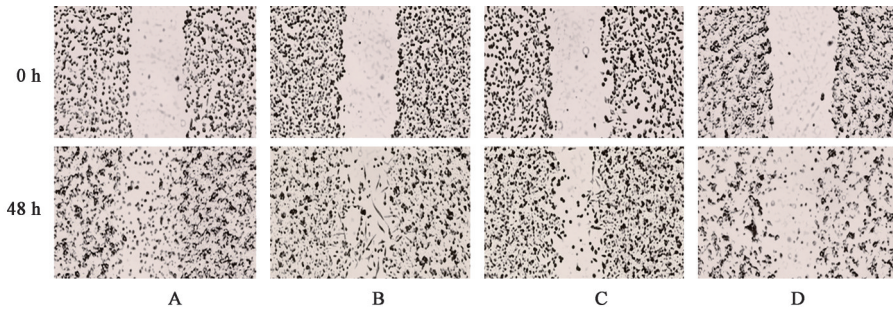
Table 2 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on survival rate of hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%	
		SK-HEP-1	Huh-7
空白组		100.00 \pm 0.96	100.00 \pm 1.00
灵芝多糖组	3.5	89.82 \pm 0.53 ¹⁾	85.07 \pm 2.41 ²⁾
	7	70.51 \pm 0.88 ²⁾	72.87 \pm 2.66 ²⁾
	14	53.68 \pm 0.85 ²⁾	59.07 \pm 1.45 ²⁾

3.2 灵芝多糖对肝癌细胞迁移能力的影响 与空白组比较,灵芝多糖组(3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用于SK-HEP-1和Huh-7细胞48 h,细胞的迁移距离明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),并且迁移距离和灵芝多糖浓度呈反比。见图1、图2、表3。

3.3 灵芝多糖对肝癌细胞周期的影响 与空白组相比较,灵芝多糖组(3.5、7、14 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)SK-HEP-1细胞S期和G₂期细胞数量随着药物浓度增加逐渐下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),SK-HEP-1、Huh-7细胞G₁期细胞比例逐渐增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明灵芝多糖诱导肝癌细胞G₁期细胞阻滞。见表4。

3.4 灵芝多糖对肝癌细胞凋亡的影响 与空白组



注: A. 空白组; B~D. 灵芝多糖组 (3.5、7、14 g·L⁻¹) (图2-图6同)

图1 灵芝多糖对SK-HEP-1细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, ×40)

Fig. 1 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on migration ability of SK-HEP-1 cells (inverted microscope, ×40)

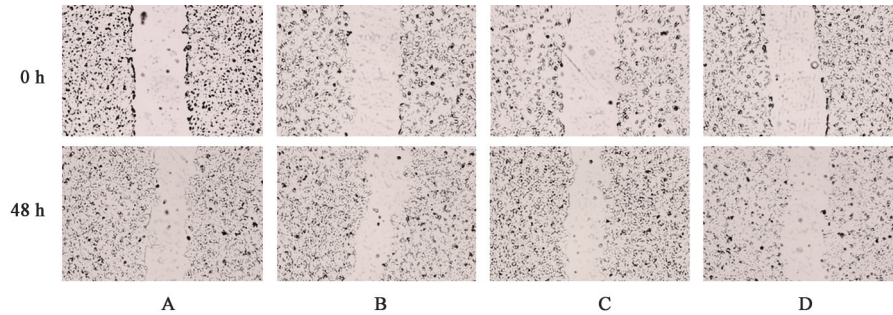


图2 灵芝多糖对Huh-7细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, ×40)

Fig. 2 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on migration ability of Huh-7 cells (inverted microscope, ×40)

表3 灵芝多糖对肝癌细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on migration ability of hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	SK-HEP-1	Huh-7
空白组		0.82±0.02	0.62±0.03
灵芝多糖组	3.5	0.70±0.01 ¹⁾	0.48±0.01 ¹⁾
	7	0.51±0.00 ²⁾	0.39±0.02 ²⁾
	14	0.32±0.03 ²⁾	0.25±0.03 ²⁾

比较,灵芝多糖组(3.5、7、14 g·L⁻¹)中凋亡细胞的数量逐渐增多。Hoechst33258是一种重要的荧光染料,染色后正常细胞呈低蓝色,凋亡细胞的细胞核

呈高亮的蓝色。空白组中绝大部分细胞呈低蓝色荧光状态,是正常细胞;灵芝多糖组出现核形态改变的肝癌细胞,凋亡细胞数量与灵芝多糖浓度呈正比。见图3、图4。

3.5 灵芝多糖对PI3K/Akt通路的影响 与空白组比较,灵芝多糖组(7、14 g·L⁻¹)明显抑制PI3K、Akt磷酸化($P<0.05, P<0.01$),呈浓度依赖性。但灵芝多糖对PI3K和Akt的表达未见明显影响。见图5、图6,表5。

4 讨论

肝癌是一种高发的恶性肿瘤,2020年全球癌症

表4 灵芝多糖对肝癌细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cycle of hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	G ₁	S	G ₂
SK-HEP-1	空白组		29.64±1.27	47.43±0.94	22.93±1.70
	灵芝多糖组	3.5	40.34±1.58 ¹⁾	44.63±1.39	15.03±2.00 ¹⁾
		7	54.12±0.83 ²⁾	39.58±1.66 ²⁾	6.29±1.98 ²⁾
		14	69.40±2.16 ²⁾	24.50±2.08 ²⁾	6.10±2.25 ²⁾
Huh-7	空白组		30.22±1.33	46.08±1.82	23.69±2.19
	灵芝多糖组	3.5	40.41±2.29 ¹⁾	45.14±2.09	14.46±2.39 ¹⁾
		7	55.99±2.00 ²⁾	37.21±1.87 ²⁾	6.80±1.55 ²⁾
		14	69.54±1.46 ²⁾	24.76±1.49 ²⁾	5.70±1.06 ²⁾

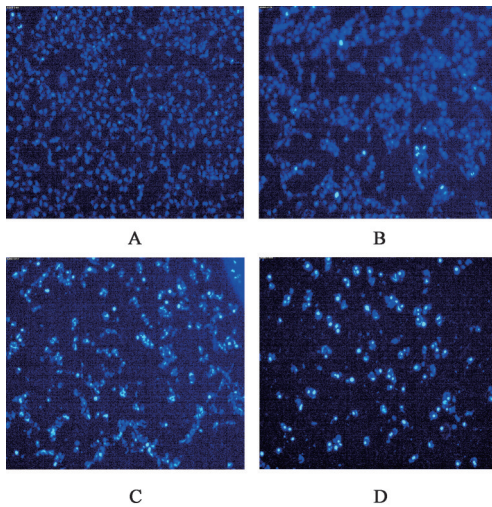


图3 灵芝多糖对SK-HEP-1细胞凋亡的影响 (Hoechst33258, ×200)
Fig. 3 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on apoptosis of SK-HEP-1 cells (Hoechst33258, ×200)

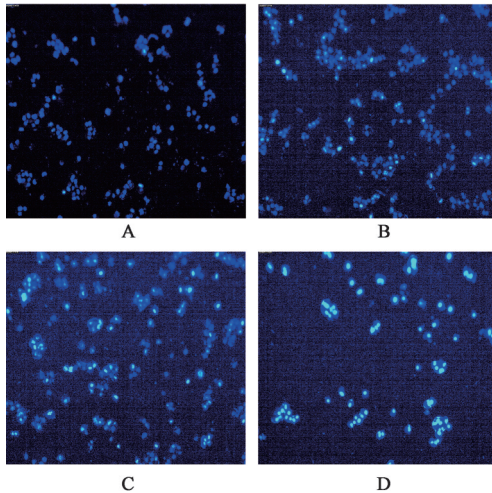


图4 灵芝多糖对Huh-7细胞凋亡的影响 (Hoechst33258, ×200)
Fig. 4 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on apoptosis of Huh-7 cells (Hoechst33258, ×200)

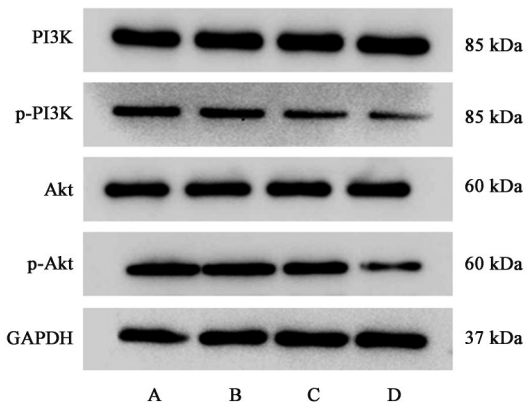


图5 灵芝多糖作用于SK-HEP-1细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on relative protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt in SK-HEP-1 cells

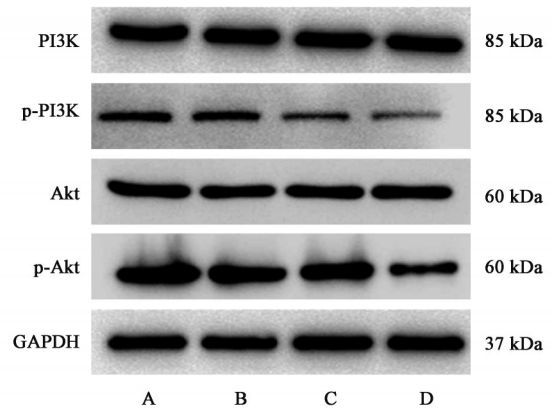


图6 灵芝多糖作用于Huh-7细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on relative protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt in Huh-7 cells

统计数据显示,全球新发肝癌人数高达91万左右,死亡率排在第2位^[13]。我国肝癌的发病率和死亡率更是接近全球发病率和死亡率的一半,并且发病率和死亡率的数值很接近^[14]。肝癌的早期诊断困难并且病情发展迅速,多数患者初次诊断即为中晚期肝癌。虽然肝癌的治疗手段在不断进步,晚期肝癌的全身治疗效果也有所提高,但这还远远不够,患者的存活率仍然很低。近年来,中药因为其不良反应小、疗效好等多种优点,在抗肿瘤药物研究方面受到广泛关注。

灵芝是我国的传统保健药材,含有丰富的活性成分,灵芝多糖就是从中提取的一种天然活性物质,不仅安全性高而且具有多种治疗和保健作用^[15-16],如抗肿瘤^[17]、抗氧化^[18]、调节免疫^[19]、降血糖血脂^[20]、抗疲劳^[21]等。多项研究表明灵芝多糖的抗肿瘤作用突出。本课题组评价了灵芝多糖对肝癌细胞SK-HEP-1和Huh-7的抗肿瘤作用,并探讨了其可能的作用机制,结果表明灵芝多糖具有开发抗肿瘤药物的潜力。

灵芝多糖具有优秀的抗肿瘤活性,对多种肝癌细胞都有抑制作用,通常剂量越高效果越显著^[22]。本研究对SK-HEP-1和Huh-7两种肝癌细胞展开体外细胞实验,CCK-8实验结果显示,与空白组比较,灵芝多糖低、中、高浓度对2种肝癌细胞的增殖有显著的抑制作用,并且灵芝多糖的浓度越高,细胞的存活率越低。此外,细胞周期实验结果显示灵芝多糖可以诱导SK-HEP-1和Huh-7细胞发生G₁期周期阻滞,随着浓度的增加,G₁期细胞逐渐增多,S期和G₂期细胞比例逐渐下降。通过诱导周期阻滞抑制

表5 灵芝多糖对肝癌细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on relative protein expression of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt in hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	PI3K/GAPDH	p-PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH
SK-HEP-1	空白组		1.14±0.07	1.30±0.02	1.02±0.08	1.34±0.11
	灵芝多糖组	3.5	1.02±0.04	1.11±0.09	0.99±0.01	1.12±0.02
		7	0.99±0.01	0.73±0.06 ¹⁾	0.87±0.23	0.81±0.12 ²⁾
		14	1.10±0.03	0.45±0.06 ²⁾	0.90±0.02	0.44±0.16 ²⁾
Huh-7	空白组		0.91±0.09	1.36±0.36	1.01±0.07	1.33±0.03
	灵芝多糖组	3.5	1.03±0.05	1.07±0.04	0.96±0.15	0.94±0.27 ¹⁾
		7	1.08±0.12	0.90±0.31 ¹⁾	1.05±0.17	0.82±0.11 ²⁾
		14	0.97±0.27	0.59±0.14 ²⁾	1.06±0.05	0.39±0.28 ²⁾

肿瘤细胞增殖是一种重要的抗肿瘤机制,灵芝多糖也曾被证明可以诱导结肠癌细胞周期阻滞,并将LoVo细胞阻滞于S期、HCT-116细胞阻滞于S和G₂/M期^[23]。有报道证明了灵芝多糖肽可以抑制睡眠片段化小鼠的B16-F10-luc-G5黑色素瘤肿瘤的转移^[24],此外,细胞实验结果显示高浓度的灵芝多糖肽可以抑制肝癌细胞Huh-7的迁移,并且诱导Huh-7细胞的凋亡^[25]。划痕实验和Hoechst33258染色结果显示灵芝多糖具有相似的抗肿瘤作用。划痕实验结果显示,与空白组比较,灵芝多糖组2种肝癌细胞的迁移能力以浓度依赖的方式显著降低。Hoechst33258染色结果显示,空白组中2种肝癌细胞普遍为低蓝色荧光状态,灵芝多糖组(3.5 g·L⁻¹)出现核形态改变的肝癌细胞,在显微镜下呈现为高亮的蓝色荧光状态,灵芝多糖浓度越高,核形态改变的细胞数越多,提示灵芝多糖可以促进肝癌细胞的凋亡。

PI3K/Akt信号通路是调控肿瘤细胞生物学过程的重要通路,活化的PI3K可以与其下游分子Akt结合,促使其磷酸化后继续激活下游的凋亡相关蛋白^[26]。此外,Akt的激活和肝癌细胞的增殖、迁移及周期调节都密切相关^[27]。蛋白免疫印迹法结果显示灵芝多糖抑制了PI3K和Akt的磷酸化,而且浓度越高,抑制作用越明显。灵芝多糖在抑制2种肝癌细胞增殖、迁移并诱导其周期阻滞和凋亡的同时,还显著下调p-PI3K和p-Akt蛋白的表达水平。因此,灵芝多糖对2种肝癌细胞恶性表型的抑制作用,与其抑制PI3K/Akt信号通路的表达有关。

综上,灵芝多糖通过调控PI3K/Akt信号通路,进而抑制SK-HEP-1和Huh-7的增殖和迁移,并且在诱导G₁期细胞周期阻滞及凋亡方面也发挥作用。这为灵芝多糖的临床应用提供一定的依据,但其对

动物模型的作用及其机制尚不明确,有待进一步的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] YANG J D, HEIMBACH J K. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma [J]. *BMJ*, 2020, doi: 10.1136/bmj.m3544.
- [2] TANG W, CHEN Z, ZHANG W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Theoretical basis and therapeutic aspects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1):87.
- [3] HATANAKA T, NAGANUMA A, KAKIZAKI S. Lenvatinib for hepatocellular carcinoma: A literature review [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(1):36.
- [4] ANWANWAN D, SINGH SK, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1):188314.
- [5] JUAID N, AMIN A, ABDALLA A, et al. Anti-hepatocellular carcinoma biomolecules: Molecular targets insights [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10774.
- [6] 李芳,余梦瑶,江南,等. 灵芝抑制肿瘤微环境中Treg细胞功能的机制[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2021, 58(2):193-199.
- [7] LIU G, ZENG T. Sporoderm-removed *Ganoderma lucidum* spore powder may suppress the proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through PI3K/Akt/mTOR and ERK pathway [J]. *Integr Cancer Ther*, 2021, 20:15347354211062157.
- [8] GUO C, GUO D, FANG L, et al. *Ganoderma lucidum*

- polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon[J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 118231.
- [9] SONG M, LI Z H, GU H S, et al. *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells by altering macrophage polarity and induction of apoptosis[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021:6696606.
- [10] HSU W H, QIU W L, TSAO S M, et al. Effects of WSG, a polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, on suppressing cell growth and mobility of lung cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 1604-1613.
- [11] FRESNO VARA J A, CASADO E, DE CASTRO J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(2):193-204.
- [12] 王博, 斯聪聪, 程国才. 响应面优化超滤膜分离灵芝多糖工艺[J]. *食品工业*, 2015, 36(12):1-4.
- [13] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [14] 万雪帅, 杜顺达, 毛一雷. 综合治疗时代晚期肝癌治疗的全局观[J]. *腹部外科*, 2021, 34(2):92-97, 100.
- [15] 王婷婷, 陈特欣, 肖建勇, 等. 灵芝多糖化学结构及药理活性研究进展[J]. *中国食用菌*, 2022, 41(1):7-16.
- [16] SEWERYN E, ZIALA A, GAMIAN A. Health-promoting of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* [J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2725.
- [17] FU Y, SHI L, DING K. Structure elucidation and anti-tumor activity *in vivo* of a polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 141:693-699.
- [18] 谢苗, 亓小妮, 张鑫, 等. 低共熔溶剂提取灵芝多糖的工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(5):123-129.
- [19] 谢文琦, 韩雯, 付璐, 等. 灵芝调节免疫细胞功能的作用机制及研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(7):219-224.
- [20] 吴睿婷, 付王威, 万敏, 等. 黑灵芝多糖对糖尿病大鼠血糖血脂调节及肠道菌群的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(5):91-102.
- [21] 李欣. 黑灵芝多糖缓解运动性疲劳的效果[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(4):59-65.
- [22] LIU Y J, SHEN J, XIA Y M, et al. The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors on human hepatocarcinoma cells? [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(3):1210-1215.
- [23] 梁曾恩妮. 灵芝多糖对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡的影响初步研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2014.
- [24] 黄在兴, 刘凌云, 陈华, 等. 灵芝多糖肽对肝癌细胞 Huh7 活性、迁移和细胞凋亡的影响[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(4):742-746.
- [25] XIAN H, LI J, ZHANG Y, et al. Antimetastatic effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide on B16-F10-luc-G5 melanoma mice with sleep fragmentation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:650216.
- [26] 仇志富, 吴晓光, 颜勇, 等. 姜黄素对脑缺血大鼠脑组织 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(19):4756-4758.
- [27] HUANG D H, JIAN J, LI S, et al. TPX2 silencing exerts anti-tumor effects on hepatocellular carcinoma by regulating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(6):2113-2122.

[责任编辑 张丰丰]