

# 灵芝肽诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的 细胞学观察

张 胜, 何 慧\*, 蔡先启, 于国才, 杜 璟  
(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 目的: 研究灵芝肽(*Ganoderma lucidum* peptides, GLP)在体外对人肝癌 HepG2 细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用。方法: HepG2 细胞用含不同浓度 GLP 培养基培养 12、24、36、48、60h, GLP 分为 5 个浓度梯度, 分别为 0.25、0.5、1、2、4mg/ml, 采用噻唑兰(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法观察细胞生长抑制作用, 用可见光显微镜、荧光显微镜观察细胞形态学变化、激光共聚焦(laser scanning confocal microscopy, LSCM)观察细胞内钙离子浓度的变化。结果: MTT 法显示灵芝肽能显著抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长, 且存在浓度及时间依赖性。镜下可见细胞出现典型凋亡细胞形态学改变: 细胞染色质浓缩, 细胞体积缩小、核固缩深染、细胞膜出泡、凋亡小体形成; LSCM 观察到胞内钙离子浓度明显增加。结论: 0.25~4.0mg/ml 的 GLP 体外可显著抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖, 存在量效关系和时效关系, 能诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡, 并且提示细胞内钙离子浓度的升高可能是细胞凋亡的机制之一。

**关键词:** 灵芝肽; 人肝癌 HepG2 细胞; 细胞凋亡

## Morphological Observation of Human Hepatoma HepG2 Cells Apoptosis Induced by *Ganoderma lucidum* Peptides

ZHANG Sheng, HE Hui\*, CAI Xian-qi, YU Guo-cai, DU Jing

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Growth inhibition effects of *Ganoderma lucidum* peptides (GLP) on human hepatoma HepG2 cells were investigated *in vitro*. The HepG2 cells were incubated with varying concentrations (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml) of GLP for 12, 24, 36, 48 and 60 h. Anti-proliferation activities of GLP were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. Morphological changes of treated HepG2 cells were observed under visible light microscope and fluorescence microscope, and changes of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration were analyzed by laser scanning confocal microscopy (LSCM). The results showed that there is significant inhibition against the growth of HepG2 cells in a dose- and time-dependant manner. Morphological alterations can be found including cell shrinkage, plasma membrane blebbing, nuclear condensation and formation of apoptotic bodies. The concentration of intracellular  $Ca^{2+}$  remarkably increases after treatment of GLP as compared with control by LSCM.

**Key words:** *Ganoderma lucidum* peptides (GLP); human hepatoma cells HepG2; apoptosis

中图分类号: S646

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)09-0195-05

灵芝(*Ganoderma lucidum*, GL)是一种非常珍贵的药食兼用真菌, 属担子菌纲、多孔菌科植物。灵芝具有很强的药理作用, 如具有免疫调节、抗肿瘤、抗癌、抗氧化等多种功效, 并且对心脑血管疾病也具有较高的药理活性<sup>[1]</sup>。目前对灵芝多糖、三萜类化合物(亦称灵芝酸)以及灵芝蛋白等的研究较为深入, 而有关灵芝肽类化合物的研究文献报道不多。灵芝肽(GLP)是灵芝的活

性成分之一, 本实验室研究表明, GLP 对小鼠肝线粒体、肝匀浆诱导自由基体系和非诱导自由基体系中MDA的形成有明显的抑制效果, 且对肝线粒体肿胀度的亦有抑制作用<sup>[2]</sup>; GLP 还具有抗磷脂氧化和还原能力<sup>[3]</sup>; GLP 对BCG/LPS诱导的小鼠免疫性肝损伤及半乳糖胺致肝损伤均有很好的保护作用<sup>[4-5]</sup>, 表明灵芝的保肝活性因子除多糖、三萜类化合物外, 还有灵芝肽<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2008-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570190); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09-4)

作者简介: 张胜(1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。E-mail: zhsh78211@sina.com

\* 通讯作者: 何慧(1960-), 女, 教授, 研究方向为食品化学和天然产物化学。E-mail: hehui@mail.hzau.edu.cn.

癌症是一种细胞凋亡过少或者被抑制、而细胞增殖过多或者失控的疾病,若能抑制癌细胞的增殖并诱导其凋亡,癌细胞就有可能停止生长。因此能够诱导癌细胞凋亡的药物将在癌症的治疗过程中发挥重要的作用。中草药单体的抗肿瘤研究是近年来肿瘤研究领域的热点之一,在诱导肝癌细胞凋亡方面,中药治疗诱导肿瘤细胞凋亡具有毒副作用小和不易复发等优点。在肿瘤手术、放疗、化疗及介入治疗的同时,按照中医辨证施治的原则,可提高临床疗效、延长肿瘤患者生存时间,提高肿瘤患者生活质量<sup>[6]</sup>。

本实验主要研究灵芝肽对人肝癌细胞(HepG2)生长的抑制作用和诱导其凋亡的作用。旨在为进一步开发灵芝的药用价值,使其作为一种安全高效的天然保肝产品应用于临床提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

灵芝子实体粉 山东冠县灵芝基地。

人肝癌 HepG2 细胞 华中农业大学国家微生物重点实验室。

RPMI-1640 培养基粉剂 GIBCO 公司;新生小牛血清 杭州四季青公司;青霉素链霉素溶液(双抗) 碧云天公司;噻唑兰(MTT)、二甲基亚砜(DMSO) 华美生物医学公司;Sephadex G-25 美国 Sigma 公司;螯合型离子交换树脂、大孔树脂 南开大学化工厂;胰蛋白酶、Hoechst 33258、Giemsa、Fluo-3/AM 鼎国生物医学公司。

### 1.2 试剂与仪器

荧光显微镜、倒置相差显微镜 日本奥林巴斯公司;Leica TCS Sp2 激光共聚焦显微镜 德国 AOBSMP 公司;(MCO-15AC)CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 日本三洋公司;A6-3022 型酶联免疫检测仪 华东电子管厂;真空冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司;PB-10 普及性 pH 计 Sartotius 公司;96 孔、6 孔培养板 武汉天源生物有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 灵芝肽(GLP)的制备方法<sup>[7-9]</sup>

按料液比 1:5 用水浸提灵芝子实体粉,4℃下浸提 2 次,每次浸泡 3~4h 后抽滤,过截留分子量 10000u 的超滤膜,收集膜透过部分(即低分子化合物部分,即 GLL, Lower molecular fraction of *Ganoderma lucidum*)。取一定量的 GLL 用 1.5% 的活性炭在温度 55℃下处理 5~10min,然后减压浓缩到一定的体积,上 Cu<sup>2+</sup>-Sephadex G-25 柱,用硼砂缓冲液(pH11.0, 50mmol/L)以 1.2ml/min 的流速洗脱,每 5min 收集 1 管,再上螯合型离子交换树脂脱去 Cu<sup>2+</sup>,用大孔树脂脱

盐,将收集的样品冷冻干燥即为灵芝肽(其中多肽总含量为 88.33%)。实验中 GLP 用培养液配制,过滤除菌,4℃保存,两周内有效。

#### 1.3.2 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 采用 RPMI-1640 完全培养基(RPMI-1640 液体培养基和新生牛血清 9:1 混匀,内含青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml, pH7.2~7.4)于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境的恒温培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长。长满 80% 左右时以 0.25% 胰蛋白酶消化传代,实验用对数生长期细胞(传代 24~48h)。

#### 1.3.3 噻唑兰(MTT)比色法细胞增殖抑制率的测定<sup>[10-11]</sup>

取对数生长期的 HepG2 细胞,以 1×10<sup>5</sup> 个细胞/孔接种于 96 孔板,每孔总体积 200 μl。在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下的培养箱中培养 4h,待细胞贴壁后,吸弃上清液,实验组每孔加入 RPMI-1640 完全培养基 100 μl,加入不同浓度的灵芝肽 100 μl,使灵芝肽的终浓度分别为 0.25、0.5、1、2、4mg/ml;同时设置阴性对照组及空白调零组(无 HepG2 细胞),每组设 5 个重复孔。培养 12、24、36、48、60h,待培养结束时,每孔加入 5mg/ml MTT 20 μl,继续在 37℃培养 4h,吸弃上清液,每孔加 100 μl DMSO,振荡 5~10min,充分溶解。用酶联免疫分析仪测定各孔的 A<sub>490nm</sub>,实验重复 3 次,按以下公式计算细胞增殖抑制率(IR)。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{实验组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100$$

#### 1.3.4 普通光学显微镜的染色观察(姬姆萨 Giemsa)<sup>[12]</sup>

取对数生长期的 HepG2 细胞,将其以 1×10<sup>6</sup> 个细胞/孔接种到 6 孔细胞培养板中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境的恒温培养箱中培养 4h,细胞贴壁后,吸弃上清液,实验组每孔加入含不同浓度灵芝肽的 RPMI-1640 培养基 2ml,使灵芝肽的终浓度分别为 0.25、1、4mg/ml;同时设置对照孔,每组设 2 个平行。于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境下培养 48h 后,吸弃上清液,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 2~3 次,在各孔中滴加 Giemsa 工作染液,室温染色 5min。用水轻轻洗去染液,于光学显微镜下观察 HepG2 细胞形态。

#### 1.3.5 荧光显微镜形态学的观察(Hoechst 33258)<sup>[12]</sup>

取洁净的盖玻片于 6 孔培养板中制作细胞爬片,细胞培养及给药均同 1.3.4,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 和饱和湿度环境下培养 48h 后,然后向各孔中加入细胞固定液(甲醇:冰乙酸=3:1,现配),于 4℃下固定 5min,蒸馏水稍微冲洗后,点加 Hoechst 33258 工作染液,染色 10min 后,再用蒸馏水冲洗,在载玻片上滴加封片液(20mmol/L 柠檬

酸、50 mmol/L 磷酸氢二钠、体积分数为 50% 甘油), 取出盖玻片置于载玻片上, 尽量避免气泡, 于荧光显微镜下观察。

### 1.3.6 激光共聚焦观察细胞钙离子浓度变化<sup>[13]</sup>

依据 1.3.4 的方法设置浓度及对照, 接种培养并给药, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境下培养 48 h 后取出待用。以 DMSO 溶解 Fluo-3/AM 后, 分装储存于 -20℃ 冰箱中备用。Fluo-3/AM 的负载用 PBS 洗涤已制备好的 HepG2 细胞 2 次, 加入 Fluo-3/AM 工作染液(10 μmol/L), 于 37℃ 避光条件下温育 40 min, 用 PBS 洗涤 2 次后, 于激光共聚焦显微镜上观察细胞状态。

### 1.3.7 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 SASV8 软件对实验结果进行统计分析, 统计方法采用 ANOVA 程序进行各实验组间的显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 GLP 对肝癌细胞 HepG2 生长的影响

MTT 比色法检测结果(表 1)显示: GLP 处理人肝癌 HepG-2 细胞后, 其生长增殖均受到抑制。在同一浓度作用下, GLP 用药组的细胞生长抑制率随 GLP 作用时间的延长而增大, 特别是在浓度为 4 mg/ml 时, 各组间的差异均达到了极显著水平( $p < 0.01$ ); 且同一处理时间内, 随着作用浓度的增加, 其生长抑制率亦增强, 在 36 h 时, 各实验组的抑制率均达到了极显著水平( $p < 0.01$ ), 在 60 h 时, 各组间的差异也达到了显著水平( $p < 0.05$ )。由此可见, GLP 对肝癌细胞 HepG2 生长抑制作用在一定程度上存在量效关系和时效关系。

### 2.2 细胞形态学变化

#### 2.2.1 普通显微镜染色观察结果

镜检结果显示, 阴性对照组(图 1D)细胞培养 48 h 后, 细胞数增多, 可见有典型的细胞分裂相, 核染弥散均匀, 少见细胞凋亡现象。给药组经 GLP 作用 48 h 后, 逐渐出现细胞凋亡特征性的形态学变化。由图 1A

及图 1B 可以看出, 细胞皱缩, 胞膜完整, 胞浆稀少或缺乏, 染成淡红色; 染色质凝聚, 染成深紫色, 细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒, 且随着 GLP 浓度的增加, 细胞核固缩碎裂的程度明显增加。

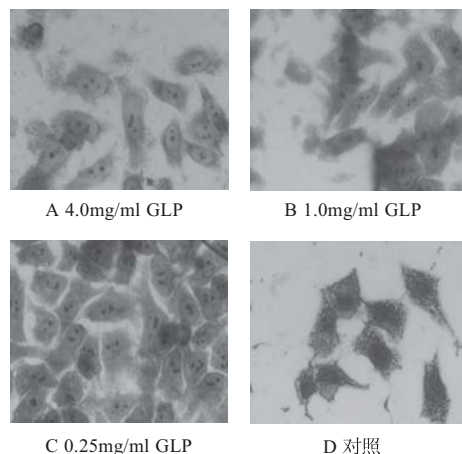


图 1 GLP 处理人肝癌 HepG2 细胞 48 h 后姬姆萨染色普通光镜观察结果 (×400)

Fig.1 Giemsa staining results of HepG2 cells treated with different concentrations of GLP for 48 h under visible light microscope (×400)

#### 2.2.2 荧光显微镜染色观察结果

Hoechst 33258, 也称 HOE 33258, 分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O · 3HCl, 分子量为 533.88, 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料, 对细胞的毒性较低。其染色常用于细胞凋亡检测, 染色后用荧光显微镜观察或流式细胞仪检测。Hoechst 33258 也常用于普通的细胞核染色, 或常规的 DNA 染色。

镜检结果显示, 阴性对照组(图 2D)细胞的细胞核呈弥散均匀荧光, 而给药组经 GLP 作用后的细胞, 其细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒, 细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 且随着 GLP 作用浓度及作用时间的增加, 细胞核固缩碎裂的程度明显增加。

表 1 不同浓度的 GLP 对 HepG2 细胞生长抑制率的影响

Table 1 Inhibition rates of different concentrations of GLP against proliferation of HepG2 cells

GLP(mg/ml)	抑制率(%)				
	12h	24h	36h	48h	60h
0.25	0.42 ± 1.27 <sup>AB(A)</sup>	0.71 ± 1.34 <sup>A(A)</sup>	2.84 ± 1.05 <sup>A(B)</sup>	10.02 ± 2.76 <sup>a/A(C)</sup>	21.73 ± 3.86 <sup>a/A(D)</sup>
0.5	2.14 ± 1.31 <sup>AB(A)</sup>	4.79 ± 1.10 <sup>A(B)</sup>	13.77 ± 3.62 <sup>B(C)</sup>	15.13 ± 4.31 <sup>a/AB(C)</sup>	31.67 ± 5.94 <sup>b/A(D)</sup>
1.0	10.86 ± 5.51 <sup>BC(A)</sup>	11.08 ± 3.48 <sup>B(A)</sup>	22.78 ± 3.70 <sup>C(B)</sup>	24.17 ± 2.98 <sup>b/BC(B)</sup>	52.26 ± 3.29 <sup>c/B(C)</sup>
2.0	17.81 ± 3.41 <sup>C(A)</sup>	21.59 ± 2.76 <sup>C(B)</sup>	38.59 ± 2.05 <sup>D(B)</sup>	39.31 ± 2.72 <sup>c/C(B)</sup>	62.61 ± 2.83 <sup>d/C(C)</sup>
4.0	31.81 ± 4.04 <sup>D(A)</sup>	42.92 ± 1.90 <sup>D(B)</sup>	47.78 ± 1.57 <sup>E(C)</sup>	51.31 ± 3.54 <sup>d/D(D)</sup>	69.26 ± 1.64 <sup>e/D(E)</sup>

注: 表中括号内字母表示相同浓度下不同时间组间的比较结果, 括号外字母表示相同时间不同浓度组间的比较结果。小写字母表示  $p < 0.05$ , 大写字母表示  $p < 0.01$ , 组间含有不同的小写字母表示有显著差异, 组间含有不同的大写字母则表示组间有极显著差异。

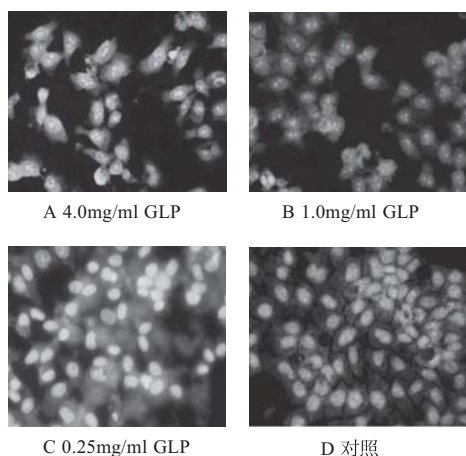


图2 GLP处理人肝癌HepG2细胞48h Hoechst 33258染色结果( $\times 400$ )  
Fig.2 Hoechst 33258 staining results of HepG2 cells treated with different concentrations of GLP for 48 h under fluorescence microscope ( $\times 400$ )

### 2.2.3 激光共聚焦观察细胞钙离子浓度结果

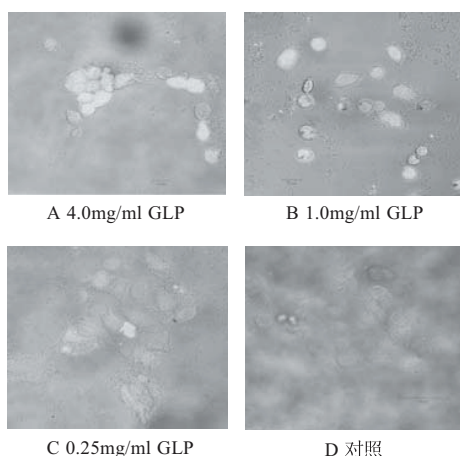


图3 GLP处理人肝癌HepG2细胞48h后胞内钙离子浓度激光共聚焦显微镜观察结果( $\times 400$ )

Fig.3 Observation results on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in HepG2 cells treated with different concentrations of GLP for 48 h under laser scanning confocal microscope ( $\times 400$ )

Fluo-3 能特异性地与钙离子结合,并在一定波长激发光激发后产生荧光,且与钙离子结合后,其荧光光谱发生变化,其荧光强度与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成正比。由图3可以看出,阴性对照组(图3D)相对于给药组荧光强度明显较弱,并且实验组随 GLP 给药浓度的增加,其荧光强度逐渐加强。

## 3 讨论

细胞凋亡是一个形态学概念,对其形态的观察是研

究凋亡的最基本方法。凋亡细胞形态学特征主要表现为细胞染色质浓缩,聚集于核边缘形,呈块状、环状或新月状;细胞膜失去微绒毛,细胞核碎裂,细胞浆浓缩有空泡出现,细胞膜出泡,形成凋亡小体<sup>[14]</sup>。本实验可见未用药的癌细胞生长良好,表现为梭形或多角形。加药后,细胞核固缩碎裂成数个圆形颗粒,细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光,且随着 GLP 作用浓度及作用时间的增加,细胞核固缩碎裂的程度明显增加。

瑞士科学家曾发现了一个八肽,它能进入肿瘤细胞,激活抗癌基因 P53,诱导肿瘤细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。朱智彤<sup>[16]</sup>对一种小分子多肽 cms024-02 进行了抗实验性肝癌的研究,结果显示 cms024-02 能显著抑制人肝癌 BEL-7402 裸鼠移植瘤的生长,并可诱导 BEL-7402 细胞凋亡。cms024-02 是我国自主研发的小分子多肽化合物,2003 年 9 月获中国食品药品监督管理局批准,作为抗肝癌药物进入 I 期和 II 期临床实验研究,取得了初步疗效<sup>[16]</sup>。细胞的许多生理代谢活动都与  $\text{Ca}^{2+}$  有关, $\text{Ca}^{2+}$  作为一种细胞内第二信使,参与多种细胞功能的调节,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载是许多细胞损伤(包括凋亡)的最后通路,有着十分重要的病理生理学意义<sup>[17-18]</sup>。钙离子本身作为一种凋亡信号,可通过调节钙离子敏感的关键酶如:蛋白激酶、磷脂酶、核酸内切酶及谷氨酰氨转移酶等诱导凋亡。本实验表明,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度随着灵芝肽作用浓度的增加而增加,使 HepG2 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载,给细胞造成严重损伤,使细胞发生坏死及凋亡<sup>[19]</sup>,表明这可能是 GLP 诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制之一。

综上所述,灵芝肽在体外可在一定程度上抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,呈时间-效应和剂量-效应的关系,能诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的改变可能是灵芝肽诱导细胞凋亡的一种机制,但其确切的凋亡机理有待进一步地研究。

## 参考文献:

- [1] 牛君仿,方正,王红庚,等. 灵芝有效化学成分研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25: 51-53.
- [2] 何慧,孙颖,谢笔钧. 水溶性灵芝肽在动物体外的抗氧化活性[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2603-2607.
- [3] 何慧,谢笔钧,刘扬虎. 灵芝肽在卵磷脂体系中的抗氧化作用研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 163-166.
- [4] 石燕玲,何慧,胡浩宇,等. 灵芝肽对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 415-418.
- [5] 石燕玲,何慧,梁润生,等. 灵芝肽对小鼠半乳糖致肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 416-419.
- [6] 许莉,宋铁芳,吴勃力. 中西药物诱导人肝癌细胞凋亡的近期研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 16: 155-156.
- [7] 何慧,孙颖,谢笔钧. 灵芝生物活性肽的分离及组成研究[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 56-57.
- [8] SUN J, HE H, XIE B J. Novel antioxidant peptides from fermented



- mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 6646-6652.
- [9] ROTHENBUHLER E, WAIBLE R, SOLMS J. An improved method for the separation of peptides and  $\alpha$ -amino acids on copper-sephade[J]. Anal Biochem, 1979, 97: 367-375.
- [10] 贺志云. 黄连素对肝癌 HepG2 细胞凋亡诱导及生长抑制作用的实验研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [11] KATY P Y, JUDY Y W, FUNG K P. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis[J]. Life Sciences, 2002, 71: 275-285.
- [12] 李龙, 陈成章. 现代毒理学实验技术原理与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 76-77.
- [13] 任丹丹, 彭光华, 王海滨, 等. 蒺藜类胡萝卜素诱导 Hela 细胞凋亡的细胞学观察[J]. 食品科学, 2006, 27(8): 240-245.
- [14] 马岚. 槐定碱对人肝癌 HepG2 细胞诱导凋亡作用及其基因调控机制的实验研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [15] CHENE P, FUCHES J, BOHN J. A small synthetic peptide, which inhibits p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumor cell lines[J]. Mol Biol, 2000, 299(1): 245-251.
- [16] 朱智彤. 小分子多肽抗实验性肝癌及其机制的初步研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2004.
- [17] 程何祥. 氧自由基、钙离子在心肌细胞凋亡中的作用及牛磺酸、胺碘酮、钾通道开放剂等的影响研究[D]. 重庆: 第四军医大学, 2001.
- [18] TONG X H, LIN S G, FUJII M K, et al. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 321: 539-546.
- [19] 王小红. 细胞凋亡的分子机理[J]. 中华中西医杂志, 2007(11): 98.