

文章编号 :1009-038X(2001)06-0599-04

松口蘑菌丝体蛋白质诱导细胞凋亡

刘萍, 陶文沂, 孙震, 唐雪明

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用深层发酵技术培养菌丝体并提取分离出的蛋白质,进行体外抗人宫颈癌 HeLa 细胞增殖及诱导细胞凋亡机理的研究. 试验发现松口蘑菌丝体水提液中活性蛋白质 TMP 在体外具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,扫描电镜观察到 TMP 处理细胞产生明显的凋亡小体, TMP 对细胞周期的影响是通过抑制细胞从 S 到 G₂M 期的转化来抑制 HeLa 细胞增殖,诱导细胞发生凋亡的. DNA 电泳出现以 200 bp 左右为单位的 DNA 碎片. 结果表明:采用液体培养方法生产的松口蘑菌丝体蛋白质,具有显著的抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡作用.

关键词:松口蘑;抗癌蛋白质;细胞凋亡

中图分类号:Q 279

文献标识码:A

The Apoptotic Effect of Active Protein from *Tricholoma matsutake* Mycelium

LIU Ping, TAO Wen-yi, SUN Zhen, TANG Xue-ming

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The antitumor effect of active material from *Tricholoma matsutake* mycelium against HeLa cell *in vitro* was studied in the paper. Active protein was separated from the mycelium produced by deep fermentation, and studied about its antitumor effect against HeLa cell *in vitro* by cell culture, scanning electron microscope, flow cytometry and DNA electrophoresis. The active protein-TMP from the mycelium of *T. matsutake* had the antitumor effect and induced apoptosis *in vitro*. TMP inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis by inhibiting cell conversion from S to G₂M stage. Therefore, The natural antitumor medicine could be volumn-produced by deep fermentation.

Key words: *Tricholoma matsutake*; antitumor protein; apoptosis

松口蘑(*Tricholoma matsutake* Sing.)系担子菌纲口蘑科真菌,含有多种活性成分,具有强身、抗肿瘤、治疗糖尿病等作用.在 27 种担子菌类抗癌食用菌中,松口蘑抗癌活性位于第二^[1,2],是重要的抗癌植物.作者采用深层发酵技术培养菌丝体并提取分离出的蛋白质,进行体外抗肿瘤研究,发现具有

较强的抗癌活性.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 松口蘑菌丝体活性蛋白的提取 TMP 菌丝体水提液经硫酸铵沉淀,收集沉淀透析除盐,过

收稿日期 2001-09-08; 修订日期 2001-11-08.

作者简介:刘萍(1970-),女(满族),吉林长春人,发酵工程博士研究生.

万方数据

DEAE-52 离子交换柱,用 HeLa 细胞作为靶细胞筛选有抑癌活性的组分,再过 Sephadex G-200 层析柱分离,得到一活性较高组分,定名为 TMP。

1.1.2 完全培养液的配制 RPMI 1640 培养液过滤除菌,用前加入 10% 小牛血清,1% 谷氨酰胺,分别加入 100 U/mL 的青霉素和链霉素溶液,用无菌的 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液调 pH 至 7.0~7.2,即为完全培养液。

1.1.3 细胞系 人宫颈癌细胞 HeLa 系苏州大学医学院提供,肉瘤-180(S-180)细胞购自中国科学院上海细胞所。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞生长在 RPMI 1640 完全培养基中,37℃,5% CO₂ 温箱培养。传代至旺盛生长后,试验 24 h 前半量换液,0.4% 台盼蓝鉴定活细胞数应为 98% 以上。所有实验均经 2 次重复证实。

1.2.2 TMP 对 HeLa 细胞生长曲线的影响 将对数生长期的 HeLa 细胞,用完全培养液悬浮并计数,调细胞浓度 8×10^4 mL⁻¹,然后将细胞接种于 24 孔培养板中,每孔 1 mL,将不同浓度的 TMP 加入各培养孔中,每种浓度设 3 个复孔,同时设完全培养液 3 孔为对照,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72、96 h 后,取出,进行细胞计数,每个组分浓度的细胞数取 3 个复孔的平均值,计算开口蘑活性物质对人 HeLa 细胞的增殖抑制率^[3]。

1.2.3 TMP 对 HeLa 细胞增殖抑制的 IC₅₀ 测定 将对数生长期的 HeLa 细胞,用完全培养液悬浮并计数,调细胞浓度 1×10^5 mL⁻¹,于 96 孔培养板中,每孔 100 μL,将不同质量浓度 TMP 加入各培养孔中,培养 48 h。培养结束后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,37℃ 继续孵育 4 h。每孔加入 50 mL 盐酸异丙醇使紫色结晶溶解,然后在酶联免疫检测仪上测定各孔在 570 nm 吸光度值。

1.2.4 TMP 对细胞形态的影响 将 HeLa 细胞用完全培养液稀释,加入细胞培养瓶中,使细胞终浓度为 5×10^4 mL⁻¹,分别加入 TMP(40 μg/mL)或生理盐水,将培养瓶移入 CO₂ 培养箱中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 48 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 洗涤两次,细胞离心后用 2%~3% 戊二醛 4℃ 固定 1 h,PBS 液洗 3 次,1% 钨酸固定 1 h,PBS 洗 3 次,酒精上行脱水,进行扫描电镜观察。

1.2.5 流式细胞术测定 TMP 对 HeLa 细胞细胞周期、细胞凋亡的影响

将 HeLa 细胞按 2×10^5 mL⁻¹ 接种于 60 mL 培

养瓶中,分别加入不同质量浓度的 TMP,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养作用 24~96 h,对照组加等量培养液^[4]。

将 TMP 培养不同时间的细胞用 PBS 漂洗,胰蛋白酶消化,收集于离心管内,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,使细胞悬浮,加 90% 冷乙醇,用吸管将细胞分散均匀,置冰箱内固定 12 h 以上。测定前离心除去乙醇,用 PBS 再洗一次后,然后离心去除上清液,加 1 500 μL 的碘化丙啶作用 15 min 以上,用 200 目尼龙网过滤,以保证样品呈单细胞悬液状态,即可上机检测。

流式细胞仪上作 DNA 细胞周期及凋亡分析,数据处理采用 B. D 公司 Cellfit 软件,每个样品均分析 5 000 个细胞。

1.2.6 TMP 对 HeLa 细胞 DNA 凝胶电泳的影响

用 TMP 或生理盐水处理后的 HeLa 细胞 3×10^6 mL⁻¹,800 g 离心 5 min,弃上清液。PBS 洗涤两遍,加入 DNA 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;150 mmol/L NaCl;10 mmol/L EDTA;0.4% SDS)0.5 mL,移入 Eppendorff 管,加入蛋白酶 K,最终质量浓度为 100 μg/mL,充分混匀,50℃ 水浴保温 3 h,不时振摇。取出,加入等体积 0.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)平衡的饱和酚,混合 10 min,室温 5 000 g 离心 15 min。吸出上清液于另一离心管中,加入等体积氯仿-异丙醇混合液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{乙醇}}=24:1$)充分混匀,室温 5 000 g 离心 15 min。吸出上清液,加入 2 倍无水乙醇及 10% 体积 NaAc(pH 5.2),-20℃ 过夜。12 000 g 离心沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤 1 次,室温干燥,适量电泳缓冲液 TE 溶解,加 RNA 酶 20 μg,37℃ 水浴 1 h。取制备的 DNA 样品,1.5% 琼脂糖凝胶电泳 2 h,电泳缓冲液为 TBE。紫外灯下观察 DNA 梯带并摄影。

1.2.7 TMP 体外增强免疫实验 取健康人的血球(分离血浆后的血制品),轻轻加在淋巴细胞分离液上,离心收集白细胞层,用 PBS 离心洗涤两次,最后用完全培养液调细胞数为 1×10^6 mL⁻¹ 备用。将细胞加入 96 孔培养板中,每孔体积 100 μL,加入不同质量浓度的 TMP(40~160 μg/mL)稳定培养 10 h 后加入 PHA(最终质量浓度为 10 μg/mL),在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 72 h。培养结束后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,37℃ 继续孵育 4 h。然后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 50 mL 盐酸异丙醇使紫色结晶溶解,然后在酶联免疫检测仪上测定各孔 570 nm 吸光度值。

2 结果与分析

2.1 TMP 对 HeLa 细胞生长周期的影响

将 HeLa 培养不同时间后计数,计算 TMP 对人 HeLa 细胞的增殖抑制率,结果见图 1.

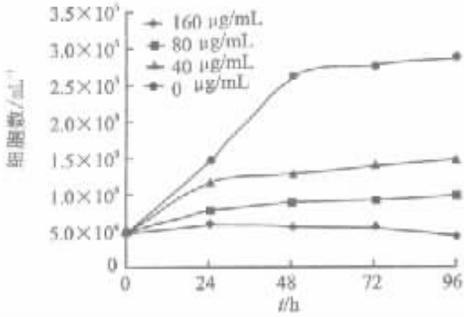


图 1 TMP 对 HeLa 细胞生长曲线的影响

Fig.1 TMP effect on cell growth curve

TMP 在质量浓度较低的情况下,对 HeLa 细胞增殖抑制作用较弱(图 1).TMP 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用与作用时间和作用剂量均相关(图 2),随着培养液中 TMP 质量浓度的增加和作用时间的延长,对 HeLa 细胞增殖抑制率不断提高.在作用 24 h 时,低剂质量浓度的 TMP 对 HeLa 细胞的增殖抑制率只有 20%,而在较高质量浓度(80~160 µg/mL)时对 HeLa 细胞的增殖抑制率为 40%~60%.在 48 h 时 40 µg/mL TMP 对 HeLa 细胞的增殖抑制率上升为 60%,160 µg/mL 时对 HeLa 细胞的增殖抑制率高达 77.1%.但总体来说,TMP 具有抑制细胞分裂的作用(图 1),对细胞的毒性不是很强烈,TMP 不能象小分子化合物那样在短时间内杀死细胞

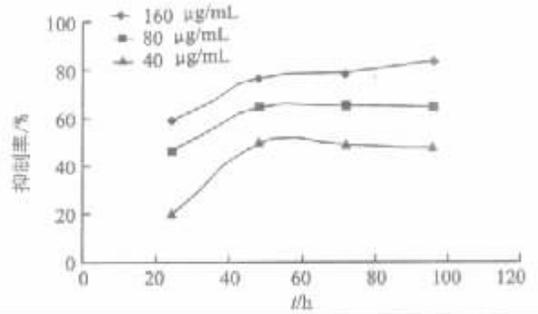


图 2 TMP 对 HeLa 细胞抑制率的影响

Fig.2 TMP effect on Hela cell antiproliferative rate

2.2 TMP 对 HeLa 细胞增殖抑制的 IC₅₀测定

从图 3 中可以看出,随着 TMP 质量浓度的增加,活细胞数量逐渐减少,但 TMP 在 0~160 µg/mL 质量浓度下并不能全部杀死癌细胞.从回归方程计算 TMP 对人 HeLa 细胞 IC₅₀ 值为 30.58 µg/mL.

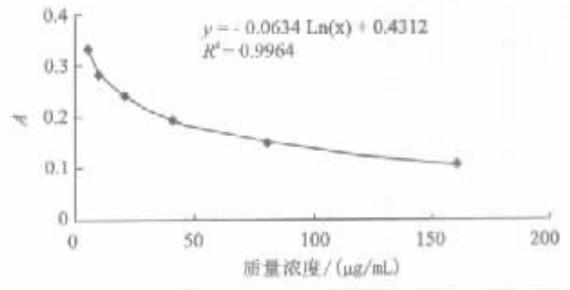
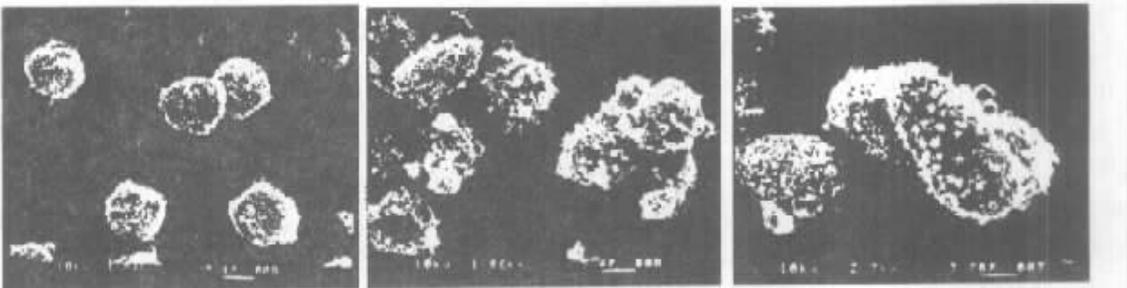


图 3 TMP 对 HeLa 细胞增殖抑制的 IC₅₀

Fig.3 The IC₅₀ of TMP against HeLa cell

2.3 TMP 对细胞形态的影响

TMP 对 HeLa 细胞形态影响,扫描电镜观察结果见图 4.



a. HeLa 细胞对照(1 840 倍) b. TMP 作用 HeLa 细胞(1840 倍) c. TMP 作用 HeLa 细胞(2 700 倍)

图 4 TMP 对 HeLa 细胞形态的影响

Fig.4 The morphological change of HeLa cells under scanning electronic telescope affter treating by TMP

从图 4 中可以看出,细胞处理 48 h 后,其形态学变化与对照组相比有明显差异.扫描电镜可见:细胞粘度增高,不易分离成单个细胞,细胞表面形成凋亡小泡(blebbing),有小泡破裂或脱落形成凋亡小体(apoptotic bodies).在 TMP 作用的 HeLa 细

胞 2 700 倍)图中可以明显地观察到凋亡小体.

2.4 流式细胞术测定 TMP 对 HeLa 细胞的细胞周期影响

TMP 对 HeLa 细胞的细胞周期影响见表 1,表 2,其中低于 G₁ 期 DNA 含量的细胞判定为凋亡细

胞.

表1 不同质量浓度的 TMP 作用 HeLa 细胞 72 h 后周期分布及细胞凋亡变化

Tab.1 Effects of different TMP concentrations against HeLa cell on the cell cycle progression

TMP 质量浓度	G/%	S/%	G ₂ M/%	凋亡百分比/%
对照	57.3	26.4	16.3	0
10 μg/mL	53.6	21.6	24.9	1.9
20 μg/mL	42.9	41.5	15.6	6.4
40 μg/mL	44	44.1	11.8	7.0
80 μg/mL	41.6	51.6	6.8	13.1

表2 80 μg/mL TMP 作用不同时间后 HeLa 细胞周期分布及细胞凋亡变化

Tab.2 Effects of TMP reaction for different time against HeLa cell on the cell cycle progression

TMP 作用时间	G/%	S/%	G ₂ M/%	凋亡百分比/%
24 h 对照	60.9	23.2	15.0	0
24 h TMP	44.2	52.8	3.0	0.7
48 h 对照	59.4	24.9	15.7	0
48 h TMP	51.1	37.5	11.4	0.5
72 h 对照	57.3	26.4	16.3	0
72 h TMP	41.6	51.6	6.8	13.1
96 h 对照	53.5	28.1	16.9	1.5
96 h TMP	48.3	49.5	2.2	41.5

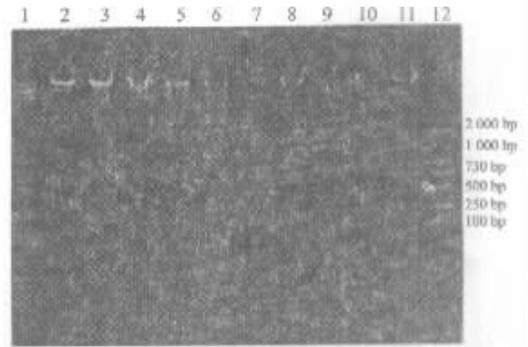
经 TMP 处理后的细胞其周期分布与对照明显不同,且不同质量浓度的 TMP 变化情况各异,培养 24 h 后,TMP 处理的 HeLa 细胞其 S 期由对照 23.2% 上升至 52.8%,G₂M 期比例从 15% 降至 3%。这表明 TMP 在最初是通过干扰细胞 S 期的通过而影响周期进行。随着 TMP 质量浓度的增高,处理细胞的 S 期比例增高,而 G₂M 期比例逐渐下降,凋亡细胞比例即亚 G₁ 峰则由 1.9% 增至 13.1%,与 S 期比例增高的幅度一致。

同一质量浓度下,随着 TMP 作用时间延长,凋亡细胞所占比例进行性上升,同时也观察到 S 期细胞比例始终保持在相当高的比例,由此推测 TMP 可能是通过抑制细胞周期中 S 到 G₂M 期的转化阶段而影响细胞的生长,进而诱导细胞发生凋亡。

2.5 TMP 对 HeLa 细胞 DNA 凝胶电泳的影响

细胞凋亡最突出的生化特征是细胞染色质的有控降解,即 DNA 双链在核小体联结子部位逐渐

断裂,形成一系列长度约为 185~200 bp 倍数的碎片。DNA 电泳显示 DNA 结构断裂,表现为梯状带型。由图 5 中可以看出,TMP 在作用 HeLa 细胞 48 h 后,开始发生 DNA 断裂,形成以 200 bp 左右为最小单位的 DNA 梯形电泳结果,处理 72 h 比 48 h 形成的 DNA 梯带明显,而处理 24 h 和对照均无 DNA 梯带。



2、3、4 分别为 80、40、20 μg/mL 的 TMP 作用 HeLa 细胞 36 h;

5、6、7 分别为 80、40、20 μg/mL 的 TMP 作用 HeLa 细胞 48 h;

8、9、10 分别为 80、40、20 μg/mL 的 TMP 作用 HeLa 细胞 72 h;

11 为培养 72 h 的 HeLa 细胞无药对照;

1 和 12 为 Marker。

图5 TMP 处理 HeLa 细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from HeLa cell after treatment with TMP

2.6 TMP 对 PHA 活化的人外周血淋巴细胞增殖的调节作用

经 PHA 活化的人外周血淋巴细胞在不同质量浓度的 TMP 作用下培养 72 h,MTT 比色法检测结果见表 3。其 OD 值的变化与质量浓度不呈正相关,高质量浓度的 TMP(80~160 μg/mL)无促增殖作用,而较低质量浓度具有明显的促增殖作用。

表3 TMP 对人淋巴细胞转化的影响

Tab.3 The effect of TMP on the lymphocyte transformation

组别	TMP 质量浓度/ (μg/mL)	OD ₅₇₀
PHA 对照组	—	0.163 ± 0.01
	20	0.190 ± 0*
PHA + TMP 处理组	40	0.210 ± 0**
	80	0.167 ± 0.006
	160	0.120 ± 0.02

注:与对照比较 * P < 0.05, ** P < 0.01。

(下转第 607 页)

一烷、己酸乙酯等。

3 结 论

1) 菌种配合是蔬菜汁乳酸菌发酵中对产酸速度和总菌数最主要的影响因素。嗜热链球菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌配合发酵的蔬菜汁诱导期最短,约1~2 h,对数期产酸速度较快,终点 pH 在 3.8~4.2,全部发酵时间约6~7 h。保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌配合发酵的总菌数最高,都在 2.0×10^8 个/mL 以上;其次是嗜热链球菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌配合,总菌数也在 1.2×10^8 个/mL 以上。

2) 大豆黄浆水可明显提高乳酸菌发酵蔬菜汁的总菌数,说明大豆黄浆水对乳酸菌生长有促进作用。

3) 嗜热链球菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌配合发酵除了产生乳酸,还可以产生较多的乙酸,因此发酵产品中的有机酸组成更为丰富。

4) 嗜热链球菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌配合发酵的蔬菜汁较未发酵的蔬菜汁,产生了较多的风味成份,除了双乙酰、异丁酮,还合成了许多小分子的醛、醇、烃、酯等。

注 本项目中有机酸及风味物质的测定工作由无锡轻工大学测试中心完成。

参考文献:

- [1] 内蒙古轻工业学校编. 乳品工艺 [M]. 北京:中国轻工业出版社,1993.
- [2] 马钢,刘英华,姜莹等. 双歧杆菌酸奶的研制 [J]. 食品与发酵工业,1992,1:13~15.
- [3] 范秀容,沈萍编. 微生物学实验 [M]. 北京:高等教育出版社,1980.
- [4] [英] A.H 罗斯编. 发酵食品 [M]. 朱庆裴,唐是雯译. 北京:中国轻工出版社,1989.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 602 页)

3 讨 论

已知的食用菌子实体、菌丝体中存在的抗癌物质其主要作用机制是增强免疫力,即是佐剂效果,因此发挥抗肿瘤效果的时间较长。河村幸雄(1994)将松口蘑子实体经水提取、凝胶过滤、阴离子交换树脂和疏水色谱层析后获得能够直接杀伤皮肤癌、子宫癌等上皮癌细胞的蛋白质^[5]。本文作者采用发酵法,从产生的菌丝体中提取的蛋白质,也具有体

外抑癌活性。作者研究发现,松口蘑菌丝体水提液中活性蛋白质 TMP 在体外抗肿瘤试验中,具有杀伤肿瘤细胞的作用。较低剂量(20~160 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时即能抑制 HeLa 细胞增殖,诱导细胞发生凋亡。表现为细胞形态异常,形成凋亡小体。随 TMP 剂量的增加和作用时间的延长,发生形态变化和凋亡的细胞数量亦相应增加。由于松口蘑是一种活体外共生菌,目前还不能进行人工栽培,产量稀少,致使国内外对其研究较少。鉴此,本项研究结果对今后批量生产抗癌的天然药物有一定参考价值。

参考文献:

- [1] 神田光治. 抗癌物质 Emitanin-51 的制造方法 [J]. 国外食用菌研究,1983,(3):199~201.
- [2] 杨新美. 中国食用菌栽培学 [M]. 北京:中国农业出版社,1988,155.
- [3] 郑建仙主编. 功能性食品(第二卷) [M]. 北京:中国轻工业出版社,1999,57~59.
- [4] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京:北京医科大学出版社,1997.
- [5] 河村幸雄,森田昭博. 抗肿瘤タンパク質の製造法 [P]. 日本专利:JP 6 80699,1994-03-22.

(责任编辑 杨 萌,朱 明)