

树舌多糖对小鼠 HepA P16 P27 Rb 基因表达的影响

王 玉, 于英君, 徐广有, 王 璐, 周 丽

王玉, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
徐广有, 齐齐哈尔医学院微形态教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
周丽, 齐齐哈尔医学院中心实验室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
于英君, 黑龙江中医药大学生化教研室 黑龙江省哈尔滨市 150040
王璐, 哈尔滨医科大学国外医学遗传学编辑部 黑龙江省哈尔滨市 150086
王玉, 女, 1970 生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族, 2001 年黑龙江中医药大学硕士, 副教授, 主要从事肿瘤遗传学研究
黑龙江省教育厅资助课题, No. 10511129
黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划, No. 1054G070
项目负责人: 王玉, 161042, 黑龙江省齐齐哈尔市, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室. wyfr@0451.com
电话: 0452-6731171
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-18

Influence Of Ganoderma applanatum polysaccharide on tumor suppressor genes P16, P27 and Rb in mice

Yu Wang, Ying-Jun Yu, Gang-You Xu, Lu Wang, Li Zhou

Yu Wang, Gang-You Xu, Li Zhou, Department of Biology and Genetics, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China
Ying-Jun Yu, Department of Biochemistry, Heilongjiang Traditional Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Lu Wang, Editorial Department of Foreign Medical Sciences in Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by Education Bureau of Heilongjiang Province, No.10511129, and Promoting Project of Excellent Teachers' Innovative Abilities in Colleges and Universities of Heilongjiang Province, No.1054G070
Correspondence to: Yu Wang, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China. wyfr@0451.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To probe into the underlying mechanism of Ganoderma applanatum polysaccharide against cancer.

METHODS: By immunohistochemistry and ELISA, we detected the expression of tumor suppressor gene P16, P27 and Rb in tumor tissues and blood serum respectively; By electron microscopy, we observed whether the apoptotic body existed or not in the tumor tissues.

RESULTS: After the treatment of Ganoderma applanatum polysaccharide, there was obvious difference in the quantities of P16, P27 and Rb genes expression between the experimental and control groups ($P < 0.01$), and there was a negative correlation of P16 and P27 expression with that of Rb ($r = -0.094$, $r = -0.446$). We observed the existence of apoptotic body in the tumor cells in the experimental group under electron microscope.

CONCLUSION: By activating tumor suppressor gene, Ganoderma applanatum polysaccharide can control the growth of tumor and accelerate the tumor cell apoptosis.

Wang Y, Yu YJ, Xu GY, Wang L, Zhou L. Influence of Ganoderma applanatum polysaccharide on tumor suppressor genes P16, P27 and Rb in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1353-1356

摘要

目的: 探讨树舌多糖抗肿瘤作用的机制。

方法: 通过免疫组化、ELISA 法分别测定瘤体和血清中抑癌基因 P16, P27, Rb 表达蛋白的量; 通过透射电镜观察凋亡小体是否存在。

结果: 树舌多糖作用后 P16, P27, Rb 基因表达蛋白的量与盐水组有差异具有统计学意义, 免疫组化结果: $^bP < 0.01$, vs (1)(2); $^aP < 0.05$, vs (2)(3); $^dP < 0.01$, vs (3). ELISA 结果: $^aP < 0.05$, vs (3); $^bP < 0.01$, $^cP < 0.05$, vs (4); $^dP < 0.01$, vs (3)(4); $^fP < 0.01$, vs (4); $^gP < 0.05$, $^hP < 0.01$, vs (3). 且 P16, P27 表达的量与 Rb 呈负相关 $r = -0.094$ (1), $r = -0.446$ (1), 再有观察到凋亡小体的存在。

结论: 树舌多糖通过激活抑癌基因, 抑制肿瘤的生长促进肿瘤细胞凋亡。

王玉, 于英君, 徐广有, 王璐, 周丽. 树舌多糖对小鼠 HepA P16 P27 Rb 基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1353-1356
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1353.asp>

0 引言

肿瘤细胞增生涉及细胞周期, 抑癌基因的主要机制之一就是使细胞分裂阻滞于细胞周期的某一时相 G_1 期, 从而抑制细胞的异常增生. 树舌多糖抑瘤效果显著^[1], 对小鼠瘤细胞 rDNA^[2] 的表达和骨髓细胞 SCE^[3] 都有影响而且差异显著, 并且树舌多糖不仅对小鼠 HepA 瘤细胞的蛋白质表达, 而且对血清蛋白表达也有影响^[4]. 说明树舌多糖抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的. 另外, 树舌多糖的抑瘤作用从免疫角度也进行了研究, 促进 HepA 瘤细胞 TNF 的表达, 提高机体的免疫力^[5]. 因此, 我们将要探讨树舌多糖作用后抑癌基因的表达及其作用途径。

1 材料和方法

1.1 材料 可移型小鼠腹水型肝癌(HepA), 由黑龙江省肿瘤研究所引进, 于无菌条件下取父带瘤小鼠的肿瘤细胞 $2 \times 10^7/L$, 以 0.2 mL 接种于小鼠右前肢腋窝外皮, 阳性率 100%. 实验选用昆明种小白鼠雄性, 质量 20 ± 2 g. 将新接种的小白鼠随机分 3 组. 接种瘤株 6 h 后用药, 第 1 组 肌肉注射树舌多糖; 第 2 组 肌肉注射薏苡多糖; 第 3 组 肌肉注射盐水, 肌肉注射每天 1 次, 第 4 组 为正常空白对照组. 连续给药 7 d, 晚禁食 12 h

后取材. P16, P27, Rb 等 ELISA 试剂盒购于 ABCAM 公司. 包被液: 0.015 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液, 含 0.2 g/L NaN_3 , 20 mL/L 的牛血清白蛋白, 4 °C 保存不超过 2 wk. 洗涤缓冲液: 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液, 含 0.5 g/L Tween20, 0.2 g/L NaN_3 , 4 °C 保存不超过 2 wk. 底物溶液: 0.1 mol/L pH5 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液, 含邻苯二胺 (OPD Sigma 公司) 0.4 g/L, 4 °C 保存不超过 2 wk. 临用前加 300 mL/L H_2O_2 1.5 mL/L. 终止液: 2 mol/L 硫酸. 酶标仪: 荷兰产 MultiSkan Ascent. 自动洗板机: 荷兰产 Wellwash 4MK2. P16, P27, Rb 等免疫组化试剂盒购于福州迈新试剂公司

1.2 方法 ELISA 法^[6] 采集眼血, 静置 20 min 后离心收集血清. 紫外 96 孔酶标板 距紫外灯高度 10 cm, 时间 20 min, 酶标板处理后, 在室温下冷却并使臭氧散去. 一块板同时作 3 个指标的检测, 向每个孔中分别加抗 P16, 抗 P27, 抗 Rb (1:100) 50 μL 混匀, 加盖封板纸, 4 °C 过夜, 第 2 d 取出, 洗板机自动洗板 5 min \times 3 次. 加入血清 (1:4) 50 μL 混匀加盖封板纸, 37 °C 培养箱 2 h 取出, 洗板机自动洗板 5 min \times 3 次. 加入二抗 (1:600) 50 μL 混匀, 加盖封板纸, 37 °C 培养箱 2 h, 洗板机自动洗板 5 min \times 3 次. 加入底物溶液 50 μL 混匀加盖封板纸, 室温、暗处放置 20 min 后, 加硫酸终止液 50 μL 终止酶促反应. 酶标板放在酶标仪下 492 nm 波长测定. 另断髓法处死小鼠, 取瘤体一部分做树脂包埋快, 另一部分做石蜡包埋快. 免疫组化采用石蜡切片, 按说明书操作, DAB 显色, 透明封片. 然后利用多媒体图像分析系统进行统计分析. 树脂包埋块, 超薄切片, 铀铅双染色后, 在投射电镜下观察凋亡细胞、凋亡小体.

统计学处理 采用 SPSS 统计学软件分析

2 结果

树舌多糖组与薏苡多糖组无差异, 与盐水组差异显著, 与空白组无差异; 薏苡多糖组与盐水组有差异, 与空白组无差异; 盐水组与空白组差异显著 (表 1).

表 1 小鼠 HepA 基因表达 ELISA 实验 (mean \pm SD, $n=7$, A)

| 基因 | 树舌多糖组(1) | 薏苡多糖组(2) | 盐水组(3) | 空白组(4) |
|-----|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| P16 | 0.379 \pm 0.051 ^{abm} | 0.390 \pm 0.067 ^{cb} | 0.305 \pm 0.058 ^c | 0.243 \pm 0.039 |
| P27 | 0.273 \pm 0.010 ^{dn} | 0.254 \pm 0.028 ^f | 0.208 \pm 0.032 ^f | 0.112 \pm 0.007 |
| Rb | 0.251 \pm 0.070 ^h | 0.337 \pm 0.089 ^g | 0.454 \pm 0.107 | 0.269 \pm 0.089 ^g |

^aP<0.05, vs (3); ^bP<0.01, ^cP<0.05, vs (4); ^dP<0.01, vs (3)(4); ^eP<0.01, vs (4); ^fP<0.05 ^gP<0.01, vs (3). ^hr=-0.094(1), ⁱr=-0.446 (1); ^mr=0.038(2), ⁿr=0.166 (2); ^mr=0.403(3), ^or=-0.035(3); ^mr=-0.743, (4) ^or=0.751(4).

免疫组化显示树舌多糖组与盐水组差异显著, 与薏苡多糖组有差异; 薏苡多糖组与盐水组有差异. 空白组由于这些蛋白的半衰期短没有检测到. 总之树舌多糖组 P16 高表达, P27 高表达, Rb 低表达; 盐水组 P16 低表达, P27 低表达, Rb 高表达 (表 2, 图 1, 2).

投射电镜下观察显示膜相结构完整, 可见凋亡小体图 1. 内膜系统结构清楚, 核固缩, 染色质周边凝集现象为凋亡细胞图 2. 盐水组线粒体肿胀图 3.

表 2 小鼠 HepA 基因表达免疫组化结果 (mean \pm SD, $n=6$, A)

| 基因 | 树舌多糖组(1) | 薏苡多糖组(2) | 盐水组(3) | 空白组(4) |
|-----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------|
| P16 | 10.766 \pm 1.591 | 8.090 \pm 1.379 ^b | 4.780 \pm 1.019 | 无 |
| P27 | 9.133 \pm 1.558 ^a | 8.09 \pm 1.626 ^d | 4.785 \pm 0.962 | 无 |
| Rb | 4.680 \pm 0.823 ^d | 6.693 \pm 1.384 ^b | 11.928 \pm 4.985 | 无 |

^bP<0.01, vs (1)(2); ^aP<0.05, vs (2)(3); ^dP<0.01, vs (3).

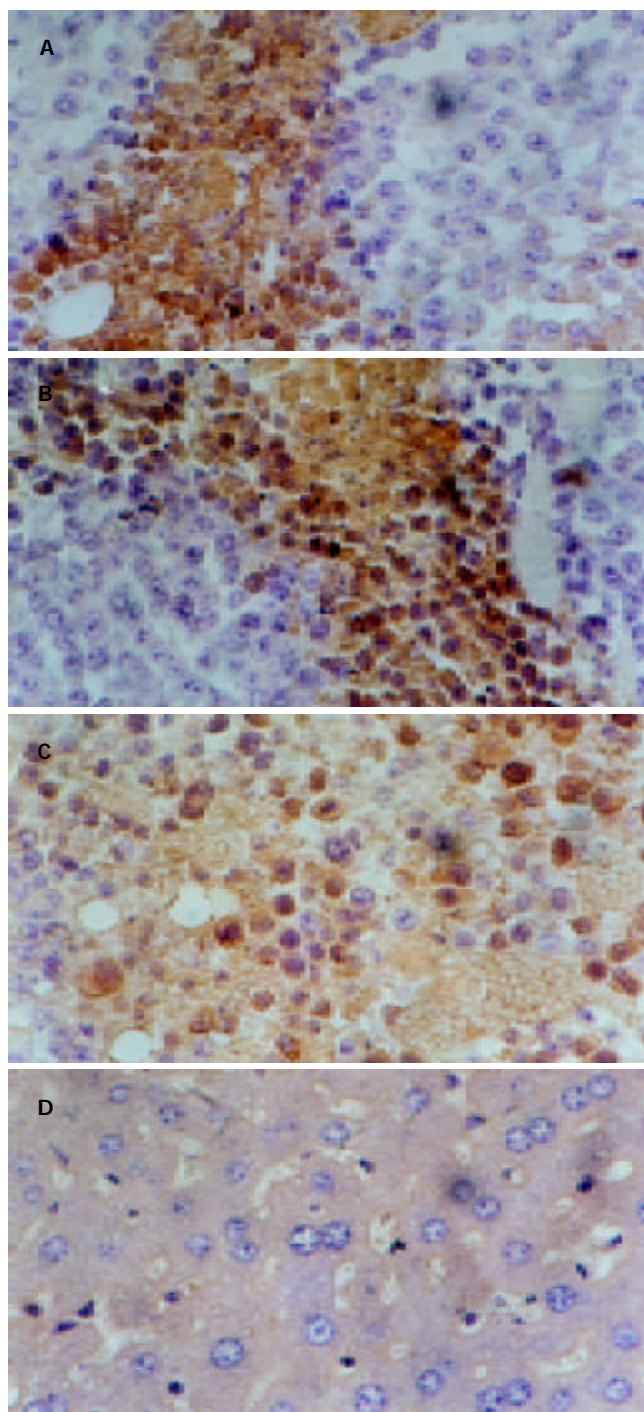


图 1 小鼠 HepA Rb 表达 SABC \times 400. A: 树舌多糖组阳性; B: 薏苡多糖组阳性; C: 盐水组阳性 D: 空白组阴性.

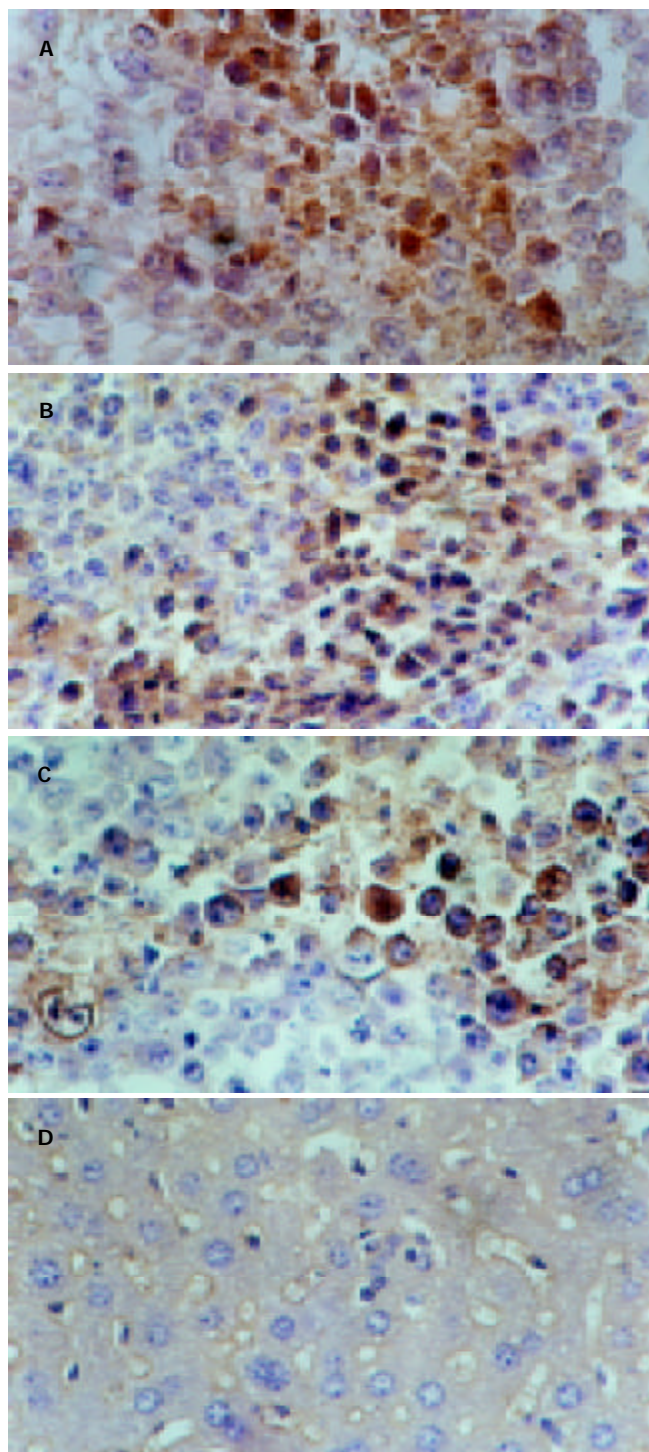


图2 小鼠HepA P16表达SABC $\times 400$. A: 树舌多糖组阳性; B: 茯苓多糖组阳性; C: 盐水组阳性; D: 空白组阴性.

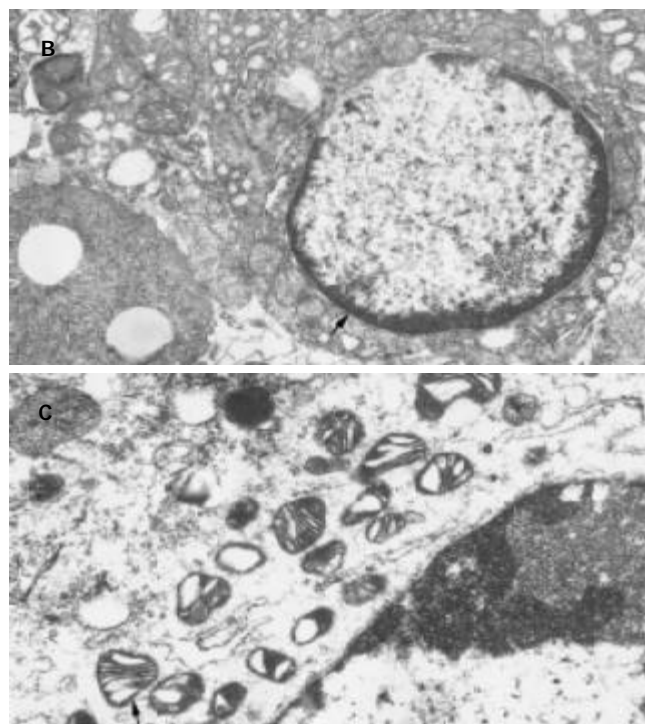
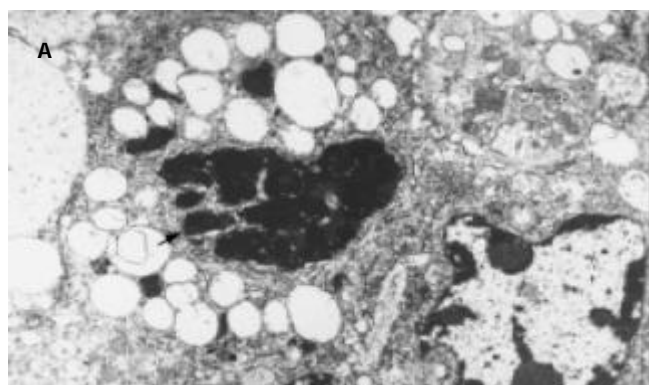


图3 小鼠HepA超微结构EM $\times 6000$. A: 树舌多糖组凋亡小体; B: 茯苓多糖组凋亡细胞; C: 盐水组线粒体肿胀.

3 讨论

本实验采用ELISA法、免疫组化法不同的方法测定树舌多糖作用后瘤细胞及血清中抑癌基因P16, P27, Rb表达蛋白的量. 发现树舌多糖的抗肿瘤作用是通过基因水平发挥作用的, 他激活抑癌基因P16, P27, Rb, 并且P16, P27表达的量与Rb呈负相关, 这与其他肿瘤的一些报道的相一致^[7]. Rb在细胞核中以失活的磷酸化或活化的磷酸化形式存在, 活化的Rb蛋白对于细胞从G₀-G₁期, 进入S期有抑制作用. Rb基因使肿瘤细胞逆转以及抑制细胞增生的作用机制尚不十分清楚, 但目前认为Rb在细胞凋亡中的调节作用可能是其中之一^[8, 15].

P27作为一种细胞周期抑制因子, 其功能已广为接受, Surendra et al 认为P27蛋白定位于细胞核是其抑制肿瘤进展的前提条件, 而出现在细胞质P27蛋白表达与患者生存期缩短有关. P27蛋白水平主要在转录后的蛋白质翻译和降解阶段进行调节. 正常情况下, 当细胞处于G₀/G₁期时, P27蛋白表达增高, 进入S期则下降. P27的主要功能是抑制细胞的生长, 当P27表达下降或缺失时, 可导致基因组的不稳定, 甚至肿瘤的发生^[11].

本实验观察到树舌多糖作用后, 通过PAGE电泳不仅在瘤细胞中检测到这些蛋白而且也同时在血清中检测到P16, P27, Rb基因表达的蛋白, 通过免疫组化, ELISA法判断P16, P27基因表达蛋白水平增加, 而Rb基因表达蛋白水平减少. 由于免疫组化不能客观地反映结果, 他只能从定性角度说明, 而ELISA却能从ng水平进行定量说明, 能真实的反映结果, 所以我们认为树舌多糖的抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的. 他刺激

抑癌基因 P16, P27 表达增加, P16 是肿瘤抑制基因, 与细胞周期密切相关, 在他与 Rb, Cyclin D₁/CDK₄ 共同组成的细胞增生调控中, P16 作为 Cyclin D₁/CDK₄ 复合物的特异性抑制而发挥作用. Rb 作为 CDK₄ 的重要底物之一, 是参与细胞周期调控的又一重要因子, 在正常细胞中存在一个负反馈网络, 即磷酸化的 Rb 增加时, 可引起 P16 蛋白表达增强, 增加的 P16 与 Cyclin D₁ 竞争结合 CDK₄, 而抑制 CDK₄ 的活性, 防止 Rb 过度磷酸化, 从而阻断 Cyclin D₁ 与 Rb 介导的转录因子 E₂F 活化使细胞免于增生周期调节失控, 起到抑制瘤细胞生长的作用. 由于 P16 蛋白作用的靶目标过于单调, 不可能完全控制肿瘤细胞的增生, 而 P27 的独特功能在于其几乎可以抑制所有的 Cyclin-CDK 复合物的激酶活性, 其中包括 Cyclin E2-CDK, 而 Cyclin E2 可能是 G₁ 期的限速因子^[9]. P27 可以阻止 Rb 的磷酸化, 使 Rb 以磷酸化和非磷酸化的形式积累, 从而影响周期的进程, 同时 P27 和 Rb 起协同作用, 通过整和调节信号, 而抑制肿瘤的发生^[10]. Hoshino et al 在研究中发现 P27 表达上调对于肿瘤细胞外信号调节激酶通路性的特异性抑制是必需的, 而该抑制又会导致肿瘤细胞完全生长抑制^[12], 所以说树舌多糖的抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的, 激活抑癌基因而达到抗肿瘤作用的.

另外树舌多糖的抗肿瘤作用是通过促进肿瘤细胞凋亡来实现的. P16, P27, Rb 野生型蛋白量低、半衰期短, 用一般的免疫组化法不能检出, 应用 ELISA 法可以检测到. 在复杂的人体“基因网络”中, P16 基因很可能是与其他基因相互作用, 共同参与细胞凋亡调控等其他生命现象. 单基因、单作用是不符合大多数生命现象调控本质的, 尤其是真核高等生命^[13]. P16 诱导肿瘤细胞凋亡的原因可能是 P16 基因通过调控细胞周期, 协同其他凋亡因子共同作用的结果, P16 基因 G₁ 期阻断而发挥作用的, P16 基因通过降低 Rb 的表达, 使肿瘤细胞增加了对凋亡的敏感性, 如再行 P53 诱导肿瘤细胞可发生凋亡. Masahiro 首次在人类肿瘤中证实 P27 表达与凋亡之间有显著的相关性, 他在研究非早期胃癌中肿瘤细胞的 P27 的表达与细胞凋亡关系时发现 P27 表达下降, 凋亡率也下降, 这与本研究相一致, P27 表达增加, 凋亡细胞增加. P27 促进凋亡的功能可能与控制肿瘤的进展相关^[14].

总之, 本实验只是探讨了树舌多糖作用后抑癌基因 P16, P27, Rb 表达蛋白的量发生了变化, 但是通过

什么途径引起的这些变化, 基因结构本身有无变化, 再有促进肿瘤细胞凋亡的过程中还有哪些基因参与有待进一步研究. 所以本课题的下一个研究内容是抑癌基因 P16, P27, Rb 与 MAPK 及 MAP 的关系以及对细胞骨架的影响, 再有抑癌基因的调节作用主要是通过转录水平进行的, 所以对 P16, P27, Rb 的启动子等序列的检测也是下一个工作重点.

4 参考文献

- 1 于英君, 杜家忠, 刘丽波, 孙巧红, 齐彦, 刘伟华. 树舌多糖对小鼠 HepA 癌细胞³H-TdR 和[6-³H]-Glucose 掺入的影响. 中医药信息 1997;3:46
- 2 王玉, 徐广有, 刘枫, 陈平, 杜维霞. 树舌多糖瘤细胞 AgNOR 表达的影响. 齐齐哈尔医学院学报 2001;22:1105-1106
- 3 王玉, 潘洪明, 刘枫. 树舌多糖对 HepA 小鼠骨髓细胞染色体 SCE 影响的研究. 中国优生与遗传杂志 2002;10:42
- 4 王玉. 树舌多糖对 HepA 小鼠瘤细胞蛋白质表达影响的研究. 医学研究通讯 2003;32:34-35
- 5 潘洪明, 于英君. 树舌多糖猪苓多糖对小鼠 HepA 瘤细胞 TNF- α 表达的影响. 中国基层医药 2002;9:486-487
- 6 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997:364-371
- 7 Howard CM, Claudio PP, De Luca A, Stiegler P, Jori FP, Safdar NM, Caputi M, Khalili K, Giordano A. Inducible pRb2/p130 expression and growth-suppressive mechanisms: evidence of a pRb2/p130, p27^{Kip1}, and cyclin e negative feedback regulatory loop. *Cancer Research* 2000;60:2737-2744
- 8 凌治萍. 细胞生物学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:238-241
- 9 Claudio PP, Stiegler P, Howard CM, Bellan C, Minimo C, Tosi GM, Rak J, Kovatich A, De Fazio P, Micheli P, Caputi M, Leoncini L, Kerbel R, Giacomo GG, Giordano A. RB2/P130 Gene-enhanced expression down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in vivo. *Cancer Research* 2001;61:462-468
- 10 Park MS, Rosai J, Nguyen HT, Capodiceci P, Cordon-Cardo C, Koff A. p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6382-711
- 11 谢启超, 胡义德. P27 研究进展. 国外医学肿瘤学分册 2003;30:48-50
- 12 Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G₁ cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 2001;276:2686-2692
- 13 Van Erk MJ, Teuling E, Staal YC, Huybers S, Van Bladeren PJ, Aarts JM, Van Ommen B. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J Carcinog* 2004;3:8
- 14 Ohtani M, Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Niki M, Mabuchi H, Nishiguchi K, Toyoda M, Ishibashi T, Tanigawa N. Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85:1711-1718
- 15 Cullinan AE, Brandt CR. Cytokine induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Mol Vis* 2004;10:315-22