

禾谷镰刀菌胞外多糖诱导 SGC-7901 细胞凋亡作用及其机制研究

王姣姣^{1,2,3},袁平川^{1,2,3},许寒池¹,
陈颖¹,张斯佳¹,田梦云¹,余子琪¹,柳春燕^{1,2,3*}¹皖南医学院安徽省多糖药物工程技术研究中心 皖南医学院药学院药物研发中心;²活性生物大分子安徽省重点实验室;
³安徽省皖南地区植物药活性筛选与再评价工程实验室,芜湖 241000

摘要:为了探究禾谷镰刀菌胞外多糖(exopolysaccharides from *Fusarium graminearum*, FGEPS)抗人胃癌细胞 SGC-7901 作用及其可能的机制,本研究利用液体培养基对禾谷镰刀菌进行发酵培养,通过醇沉、脱色、脱蛋白和透析分离得到胞外多糖,并通过高效凝胶渗透色谱、红外光谱和紫外光谱对其进行分析。采用 CCK-8 法分别检测 FGEPS 对人胃癌细胞 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 的增殖抑制作用,通过 AnnexinV-FITC/PI、Hoechst 33258 及 JC-1 染色分析 FGEPS 对筛选出的 SGC-7901 细胞凋亡的影响,进一步通过 Western blot 法检测促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平。结果表明从禾谷镰刀菌发酵液中分离出的胞外多糖具有多糖特征吸收峰,不含有多肽核酸类物质,液相色谱显示含有 4 个多糖组分。CCK-8 结果显示 FGEPS 对 SGC-7901 细胞的抑制效果最为显著,能显著降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位,诱导细胞核染色质浓缩,并产生凋亡小体($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。FGEPS 能上调 SGC-7901 细胞中促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达($P < 0.001$)。综上所述,我们从禾谷镰刀菌发酵液中首次分离出的 FGEPS 能通过线粒体途径诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡。

关键词:禾谷镰刀菌胞外多糖;SGC-7901;细胞凋亡;线粒体通路

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)7-1204-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.7.014

Mechanism of apoptosis induced by exopolysaccharides from *Fusarium graminearum* on SGC-7901 cells

WANG Jiao-jiao^{1,2,3},YUAN Ping-chuan^{1,2,3},XU Han-chi¹,
CHEN Ying¹,ZHANG Si-jia¹,TIAN Meng-yun¹,YU Zi-qi¹,LIU Chun-yan^{1,2,3*}¹Wannan Medical College Drug Research & Development Center, School of Pharmacy, Anhui Provincial Engineering Research Center for Polysaccharide Drugs, Wannan Medical College;
²Anhui Province Key Laboratory of Active Biological Macro-Molecules;
³Provincial Engineering Laboratory for Screening and Re-evaluation of Active Compounds of Herbal Medicines in Southern Anhui, Wuhu 241000, China

Abstract: To investigate the effect and mechanism of exopolysaccharides from *Fusarium graminearum* (FGEPS) on human gastric cancer SGC-7901 cells. *Fusarium graminearum* was fermented in liquid medium. The exopolysaccharides were separated by alcohol precipitation, decolorization, deproteinization and dialysis, and analyzed by high performance gel permeation chromatography (HPGPC), infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectroscopy. CCK-8 method was used to detect the proliferation inhibition activity of SGC-7901, BGC-823, and MGC-803 cells. Effects of FGEPS on apoptosis of SGC-7901 cells were analyzed by Annexin V-FITC/PI, JC-1 and Hoechst 33258 staining. The expressions of pro-apoptotic proteins Bax, Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9 and anti-apoptotic protein Bcl-2 were detected by Western blot. FGEPS was isolated from the

收稿日期:2021-11-02 接受日期:2022-05-05

基金项目:国家级/省级大学生创新创业训练计划(202110368058, 202010368025, S202010368047);安徽省高校自然科学研究重大项目(KJ2021ZD0101)

*通信作者 E-mail:cyliu6893@126.com

fermentation broth of *Fusarium graminearum*, which had the characteristic absorption of polysaccharides and contained four components. *In vitro* anti-tumor activity assay showed that FGEPS inhibited SGC-7901 cells more significantly than BGC-823 and MGC-803 cells. FGEPS could significantly reduce the mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells, induce the concentration of nuclear chromatin, and produce apoptotic bodies ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). FGEPS could raise the expression of pro-apoptotic proteins Bax, Cleaved Caspase-3 and Cleaved Caspase-9 in SGC-7901 cells ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), and reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.001$). In summary, FGEPS isolated from the fermentation broth of *Fusarium graminearum* could induce apoptosis of SGC-7901 cells through mitochondrial pathway.

Key words: exopolysaccharides from *Fusarium graminearum*; SGC-7901; apoptosis; mitochondrial pathway

胃癌是全球第五大常见癌症和第三大癌症死亡原因^[1],在进展期多采用化疗,常见化疗药物如顺铂和5-氟尿嘧啶等,然而化疗药物的耐药性和毒性导致患者生存率较低^[2,3]。多糖作为天然高分子聚合物及其衍生物,空间结构复杂,生物活性多样^[4]。许多研究表明,多糖在防止肿瘤发生和抑制肿瘤生长中具有良好的效果^[5],其能够通过调控肿瘤细胞中多种信号转导途径和癌基因的表达,从而改变细胞膜流动性,抑制肿瘤侵袭和转移,以及诱导细胞发生凋亡和周期阻滞等^[6-8]。

本课题组长期致力于从真菌发酵液中分离和发现具有抗肿瘤作用的活性多糖,在广泛的筛选中我们发现,从苹果链格孢菌发酵液中分离出的胞外多糖具有良好的抗肿瘤活性^[9],这提醒我们植物病原菌可能是抗肿瘤活性多糖的一个重要来源。禾谷镰刀菌又名禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*),能够侵染小麦,致使病穗上出现粉红色或橘红色的霉状物,引发植物赤霉病^[10,11]。本研究首次从禾谷镰刀菌发酵液中分离得到禾谷镰刀菌胞外多糖,经过体外筛选发现,FGEPS能够显著抑制人胃癌细胞SGC-7901的增殖。本文通过对禾谷镰刀菌胞外多糖体外抗胃癌SGC-7901作用及其机制的探究,为开发抗胃癌活性多糖药物提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与材料

1.1.1 主要仪器

LC-20AP 半制备高效液相色谱仪(日本 Shimadzu); Epoch 全波长酶标仪(美国 BioTek); G3000pxwl 型色谱柱(日本 TOSOH BIOSCIENCE); CO₂ 培养箱(美国 SIM INTERNATIONAL GROUP); FACSVerse 流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company); BX53 荧光正置显微镜, IX51 荧光倒置显微镜(日本 Olympus Corporation); WIX-miniPR02 迷你垂直电泳槽, WIX-miniBLOT 迷你转印槽, WIX-EP600 通用电泳仪电源(伟克斯科技有限公司); Amersham Imager

600 全自动化学发光凝胶成像分析系统(美国 General Electric Company)。

1.1.2 主要试剂

RPMI 1640 基础培养基(Cat. NO.: 8121075, GIBCO 公司); 胎牛血清(Cat. NO.: S711-001S, LONSA SCIENCE SRL 公司); CCK-8 试剂盒(Cat. NO.: C0037)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(Cat. NO.: C1062M)、Hoechst 33258 染色试剂盒(Cat. NO.: C0003)、JC-1(Cat. NO.: C2006)、SDS-PAGE 配胶试剂盒(Cat. NO.: P0012A)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 $5 \times$ (Cat. NO.: P0015)、BCA 试剂盒(Cat. NO.: P0009)、RIPA 裂解液(Cat. NO.: P0013B)购自碧云天生物科技公司; 彩色预染蛋白标准品(Cat. NO.: 26616, Thermo Science 公司); Bcl-2(Cat. NO.: A0208)、Bax(Cat. NO.: A7626)、Cleaved Caspase-3(Cat. NO.: A0214)、Cleaved Caspase-9(Cat. NO.: A2636)、ACTB(Cat. NO.: AC026)抗体购自 ABclon Technology 公司。

1.1.3 实验细胞与菌种

人胃癌细胞 SGC-7901(Cat. NO.: C6795)、BGC-823(Cat. NO.: C6123)和 MGC-803(Cat. NO.: C6582)购自碧云天生物技术有限公司,已在原公司完成细胞 STR 鉴定; 禾谷镰刀菌菌种来自于山东省农业科学院植物保护研究所齐军山研究员馈赠,细胞及菌种现保存于安徽省多糖药物工程技术研究中心。

1.2 实验方法

1.2.1 禾谷镰刀菌的培养和发酵

PDA 培养基配制^[12]: 200 g 马铃薯切碎并加水煮沸 30 min, 纱布过滤后加入 17 g 琼脂并加热溶解,继续加入 15 g 葡萄糖后补水至 1 L,分装后高压蒸汽灭菌。液体培养基配制^[13]: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 2 g, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.25 g CaCl₂, 加纯水定容至 1 L。300 mL 锥形瓶分装,每瓶 200 mL,灭菌备用。菌种使用 PDA 平面培养基在 28 °C 恒温培养,并活化 3 ~ 5 天,在菌丝长势良好

但未产生孢子前,挑取边缘菌丝接入液体培养基中,在 28 ℃、150 r/min 的条件下恒温发酵培养 7 天^[14,15]。

1.2.2 FGEPS 的制备

发酵液过滤去除菌丝体,60 ℃减压浓缩,加入四倍体积 95% 乙醇混匀,4 ℃下静置 12 h。离心保留沉淀并加入超纯水在 60 ℃加热溶解,再次离心后保留上清。D101 大孔树脂脱色^[16],蒽酮硫酸法检测并收集洗脱液,进一步使用 Sevage 试剂法^[17]($V_{\text{三氯甲烷}}:V_{\text{正丁醇}}=4:1$, $V_{\text{多糖溶液}}:V_{\text{Sevage试剂}}=4:1$)对多糖溶液进行脱蛋白。0.22 μm 滤膜过滤除菌后,使用再生纤维素透析袋(截留分子量 3 500 Da)于 4 ℃下透析 72 h,收集截留液冷冻干燥得到胞外多糖 FGEPS。

1.2.3 红外和紫外光谱扫描

FGEPS 使用 KBr 压片,并于傅里叶红外光谱仪在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 范围进行扫描^[18]。精密称取 FGEPS 使用超纯水配制成 5 mg/mL 溶液,使用紫外可见分光光度计在 190 ~ 400 nm 波长范围进行扫描。

1.2.4 高效凝胶渗透色谱

采用高效尺寸排阻色谱法测定分析 FGEPS,色谱条件:RID-10A 示差折光检测器,G3000pxwl 型色谱柱(内径×长度:7.8 mm × 30 cm,东曹株式会社),柱温 40 ℃,流速 0.7 mL/min,流动相为超纯水,定量环 20 μL,样品浓度 5 mg/mL。

1.2.5 细胞培养及 CCK-8 测定细胞增殖抑制

人胃癌细胞系 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 细胞株使用 1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 1640 基础培养基)培养,在 5% 的 CO_2 、37 ℃条件下恒温培养,细胞处于对数生长期时可用于实验。

取对数期 SGC-7901 细胞,培养于 96 孔细胞培养板内。每孔加入 100 μL 细胞悬液(5×10^4 个/mL),培养箱中孵育 12 h 待细胞贴壁后,每孔分别加入 100 μL 含有不同浓度 FGEPS 的完全培养基,使其终浓度为 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mg/mL(每组设 5 个复孔),继续培养 24 h。采用 CCK-8 试剂盒进行细胞增殖检测。BGC-823 和 MGC-803 细胞的培养、给药处理及增殖抑制测定的方法同上。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

式中, $A_{\text{对照组}}$:不含药物组的吸光度; $A_{\text{给药组}}$:加入各浓度 FGEPS 处理组的吸光度。

1.2.6 细胞形态分析

取对数期 SGC-7901 细胞,六孔板每孔加入 1 mL 细胞悬液(3×10^5 个/mL),吹打分散均匀。贴壁后弃去培养基并以 PBS 润洗后,加入 1 mL 含 FGEPS 完全培养基(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL),处理 24 h 后,使用倒置显微镜观察并拍照。

1.2.7 Hoechst 33258 染色

取对数生长期 SGC-7901 细胞,调整细胞密度至 1.5×10^5 个/mL。在 6 孔板中放置细胞爬片盖玻片,每片上加入细胞悬液 200 μL 继续培养。细胞贴壁后在细胞密度为 50% ~ 80% 时,弃去培养基并加入含 FGEPS(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL)完全培养基。处理 24 h 后,弃去培养液,加入 0.5 mL 固定液在 4 ℃下固定 12 h。弃去固定液后,PBS 清洗两遍。加入 0.5 mL 的 Hoechst 33258 染色液,染色 5 min。PBS 清洗两遍,抗荧光淬灭封片液封片,使用正置荧光显微镜观察并拍照。

1.2.8 AnnexinV-FITC/PI 染色

取对数生长期 SGC-7901 细胞,六孔板每孔加入 1 mL 细胞悬液(3×10^5 个/mL)。贴壁后弃去培养基并以 PBS 润洗,分别加入 1 mL 含 FGEPS 的完全培养基(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL)。处理 24 h 后消化、离心收集细胞。结合液重悬分散细胞后,各组依次加入 5 μL 的 AnnexinV-FITC 荧光探针和 10 μL 的 PI 染液,混匀后在 20 ~ 25 ℃下避光孵育 20 min。流式细胞仪检测,Flowjo 软件分析。

1.2.9 JC-1 染色

取对数生长期 SGC-7901 细胞,调整细胞密度至 3×10^5 个/mL。在 6 孔板中放置盖玻片,每孔加入细胞悬液 1 mL 继续培养。细胞贴壁后在细胞密度为 50% ~ 80% 时,弃去培养基并加入含 FGEPS 完全培养基(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL)。处理 24 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤后加入 1 mL 胰酶消化液(不含 EDTA)消化细胞,待消化结束后移除胰酶消化液,加入新的培养液,吹打后慢速离心收集细胞,0.5 mL 培养液重悬后加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,轻弹混匀,37 ℃孵育 20 min。孵育结束后用预冷的 JC-1 染色缓冲液(1 ×)洗涤 2 次并重悬,使用流式细胞仪分析。

1.2.10 Western blot

取对数期 SGC-7901 细胞,培养于 6 孔板中。每孔加入 1 mL 细胞悬液(5×10^5 个/mL)。贴壁后,弃去培养基并以 PBS 润洗,分别加入 1 mL 含

FGEPS 的完全培养基(0、0.5、1.0、1.5 mg/mL)继续培养 24 h。弃去培养基冰上裂解后,4 ℃ 下以 12 000 g 离心 10 min,提取细胞总蛋白。BCA 法调整各组样品蛋白浓度后,按体积比 4:1 将样品蛋白与上样缓冲液 5 × 混合后,煮沸变性。实验组每孔上样蛋白 20 μg,体积 10 μL,进行电泳、转膜、封闭,一抗孵育(1:1 000 稀释)和二抗(1:10 000 稀释)孵育,使用化学发光显影曝光,Image J 软件分析。

1.2.11 统计学分析

所有数据均采用均数 ± 标准差进行统计和描



图1 禾谷镰刀菌胞外多糖的制备

Fig. 1 Preparation of FGEPS

2.2 IR、UV 光谱分析

图2A为FGEPS的红外光谱。3 600 ~ 3 200 cm^{-1} 处的吸收带是-OH的伸缩振动吸收峰,此区域的吸收峰为糖类的特征吸收峰。3 377 cm^{-1} 为O-H的伸缩振动吸收峰,是糖类的特征峰;2 929 cm^{-1} 处的吸收峰是多糖的C-H伸缩振动;1 649 cm^{-1} 处的吸

述,使用SPSS 13.0软件进行分析,多组均数的比较,使用单因素方差分析,两组间差异采用Dunnett-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 多糖提取及分离

如图1所示,禾谷镰刀菌菌种活化后长势良好,挑取边缘菌丝接种到共8 L液体培养基中,发酵7天后收集发酵液,经过醇沉、脱色、脱蛋白、透析和冻干后,得到禾谷镰刀菌胞外多糖670 mg,多糖得率为83.75 mg/L。

收峰为结晶水引起;1 539 cm^{-1} 处的吸收峰为C=O的伸缩振动峰;1 415 cm^{-1} 处的吸收峰是C-O的伸缩振动峰;1 030 cm^{-1} 处的吸收峰为O-H的变角振动引起。红外光谱表明通过方法“1.2.2”制备最终得到的成分是多糖。如图2B所示,FGEPS在260 ~ 280 nm内无紫外吸收,表明该多糖中不含有多肽及核酸类物质。

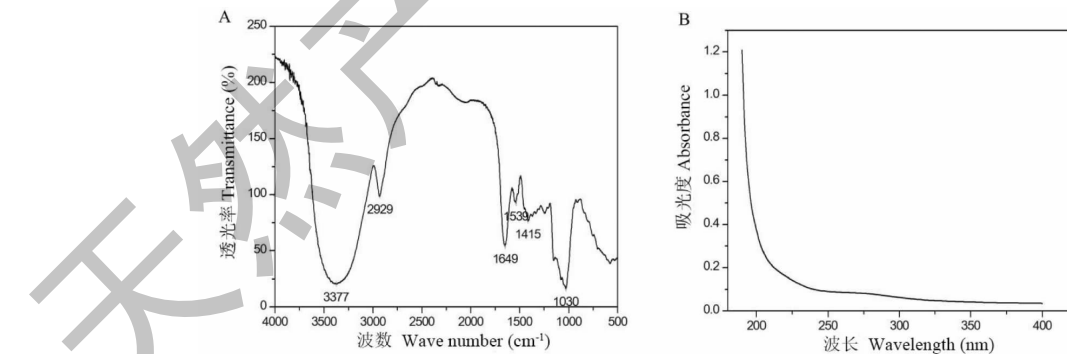


图2 FGEPS的红外和紫外光谱

Fig. 2 Infrared and ultraviolet spectra of FGEPS

2.3 HPGPC 分析

脱色脱蛋白及透析处理后的禾谷镰刀菌胞外多糖,经HPGPC分析显示共有四个组分,结合红外光谱表明该物质是多糖成分,紫外扫描显示不含有多肽核酸类物质,经透析去除3 500 Da分子量以下的

物质,因此该色谱图出峰均为多糖物质引起。如图3所示,HPGPC表明FGEPS含有四个组分。1号峰保留时间(retention time, t_R)为8.207 min,峰面积占比75.99%;2号峰 t_R = 9.637 min,峰面积占比17.86%;3号峰 t_R = 10.079 min,峰面积占比3.45

%、4号峰 $t_R = 10.212$ min, 峰面积占比 2.70%。从保留时间来看, 1号峰保留时间最短, 组分相对分子量最大。结合各组分含量占比分析, FGEPS 发挥生物学活性的成分可能主要是 1号峰所在的组分。

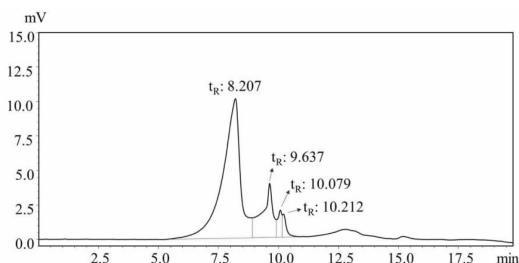


图3 FGEPS 的高效凝胶渗透色谱

Fig. 3 High performance gel permeation chromatography of FGEPS

2.4 细胞增殖

如图 4 所示, 使用不同浓度的 FGEPS 分别处理人胃癌 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 细胞 24 h 后, 相比对照组, FGEPS 在浓度为 0.8 mg/mL 之后,

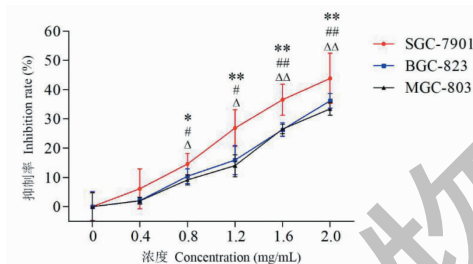


图4 FGEPS 对 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of FGEPS on proliferation of SGC-7901, BGC-823 and MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注: 与 SGC-7901 对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BGC-823 对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 MGC-803 对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。Note: Compared with SGC-7901 control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with BGC-823 control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with MGC-803 control group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

能够显著抑制三种胃癌细胞的增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在 2 mg/mL 时对 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 细胞的抑制率分别为 $(43.86 \pm 8.57)\%$ 、 $(36.21 \pm 2.52)\%$ 和 $(33.45 \pm 2.18)\%$ 。由图 4 知 FGEPS 对三种人胃癌细胞的增殖均有抑制作用, 而对 SGC-7901 细胞的抑制效果最显著, 且具有浓度依赖性, 后续实验选择 SGC-7901 细胞为研究对象。

2.5 细胞形态

如图 5 可见, 正常组细胞形态清晰, 数量较多。给予 FGEPS 处理后, 细胞均呈现皱缩、变形, 细胞膜出现发泡现象, 甚至出现死细胞。1.5 mg/mL 的 FGEPS 处理组, 细胞由于凋亡使得活细胞数量明显减少, 细胞严重收缩变形。结果表明, FGEPS 可导致 SGC-7901 细胞收缩变形、细胞膜发泡。

2.6 Hoechst 33258 染色

细胞染色质经过 Hoechst 33258 染色后, 在荧光显微镜下正常细胞的细胞核为蓝色, 而凋亡细胞由于染色质固缩呈现致密浓染, 颜色发白并较为明亮。如图 6 所示, 随着给药剂量的增加, 细胞凋亡现象加重, 出现较多的凋亡小体。此外在 1.5 mg/mL 时, 细胞数量减少, 细胞核明显缩小。

2.7 Annexin V-FITC 双染

细胞凋亡早期时磷脂酰丝氨酸外翻, 能够被 Annexin V-FITC 结合。而坏死细胞或凋亡晚期丧失细胞膜完整性后的细胞核能够被碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 结合。如图 7 所示, 随着 FGEPS 剂量的增大, SGC-7901 细胞凋亡率显著增加, 对比对照组, 1.0 mg/mL 时凋亡率为 $(12.18 \pm 2.16)\%$ ($P < 0.01$), 1.5 mg/mL 时, 凋亡率为 $(15.69 \pm 0.51)\%$ ($P < 0.001$)。结果表明, FGEPS 能够诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡, 并伴有浓度依赖性。

2.8 JC-1 染色

线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的下降是细胞凋亡的标志之一, JC-1 是一种良好的荧光探针, 当膜电位较高时, JC-1 聚合于基质中产生红色荧光; 而当膜电

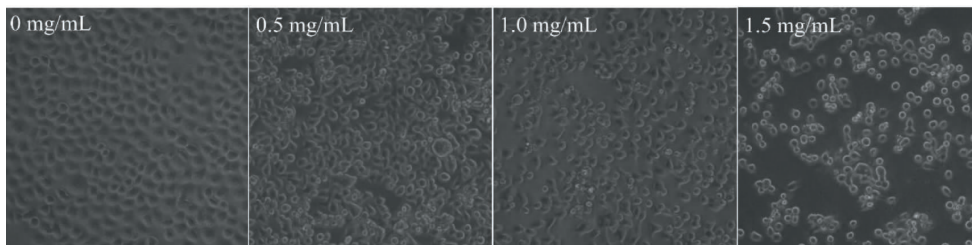


图5 FGEPS 对 SGC-7901 细胞形态的影响 ($\times 200$)

Fig. 5 Effect of FGEPS on the morphology of SGC-7901 cells

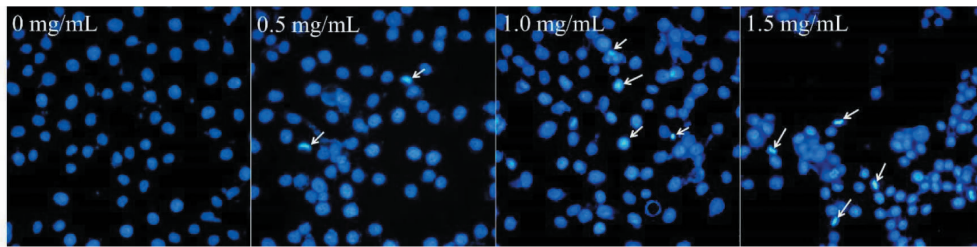


图6 FGEPS对SGC-7901细胞染色质的影响($\times 400$)

Fig. 6 Effect of FGEPS on chromatin of SGC-7901 cells

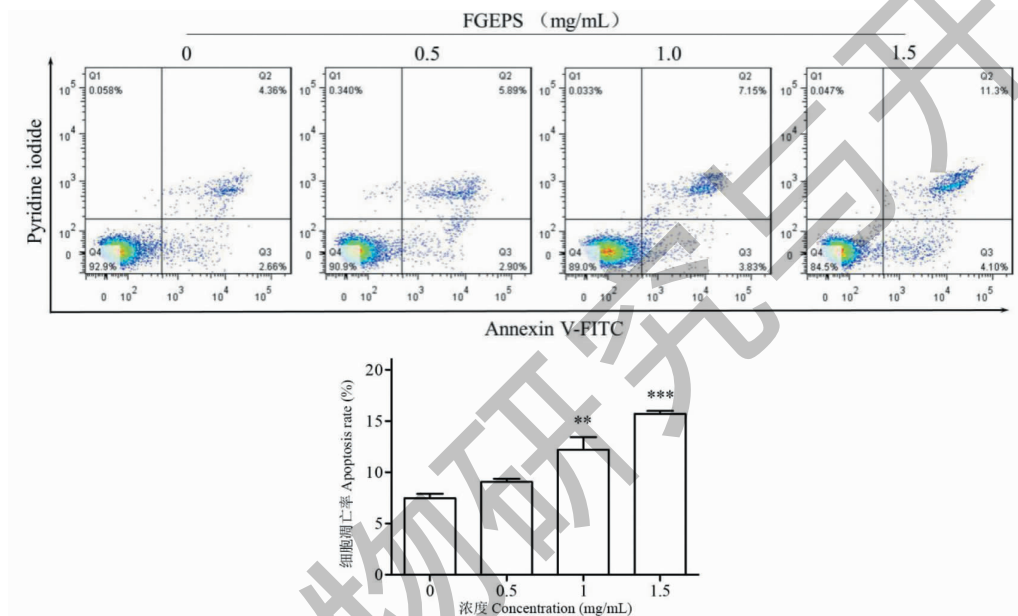


图7 FGEPS对SGC-7901细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of FGEPS on apoptosis of SGC-7901 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

位较低时, JC-1 以单体形式存在, 发出绿色荧光。如图 8 所示, 随着 FGEPS 剂量的增大, SGC-7901 细胞线粒体膜电位水平显著降低, 与对照组相比, 1.0 mg/mL 时的线粒体膜电位水平为 $(10.73 \pm 1.16)\%$ ($P < 0.05$), 给药浓度为 1.5 mg/mL 时, 膜电位水平为 $(12.1 \pm 1.83)\%$ ($P < 0.01$)。结果表明, FGEPS 能够显著降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位水平, 并伴有浓度依赖性。

2.9 Western blot

如图 9 所示, 对比空白组, FGEPS 能够显著上调 SGC-7901 细胞中促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 并下调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达 ($P < 0.001$), 表明线粒体介导的凋亡途径在 FGEPS 诱导

胃癌 SGC-7901 细胞凋亡过程中发挥着重要作用。

3 讨论与结论

天然产物一直是医药开发的宝库, 在疾病治疗中发挥着巨大作用, 就抗肿瘤而言, 如紫杉醇、喜树碱、鬼臼毒素、长春碱等, 这些天然药物不仅具有应用效果, 同时也为新化合物的合成提供了思路和参考^[19-21]。真菌发酵过程中次级代谢产物是活性多糖的重要来源, 从黑根霉发酵液中分离得到的胞外多糖 EPS, 通过激活小鼠结肠癌 CT26 细胞中的 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 途径, 以剂量和时间依赖性的方式抑制细胞生长并促进细胞凋亡^[22]; 拟康氏木霉胞外多糖以剂量依赖性方式增加 Caspase-9 和 Caspase-3 的活性, 增加 Bax/Bcl-2 的比例, 促进细胞色素 C (Cyt-C) 向细胞质释放, 通过固有线粒体

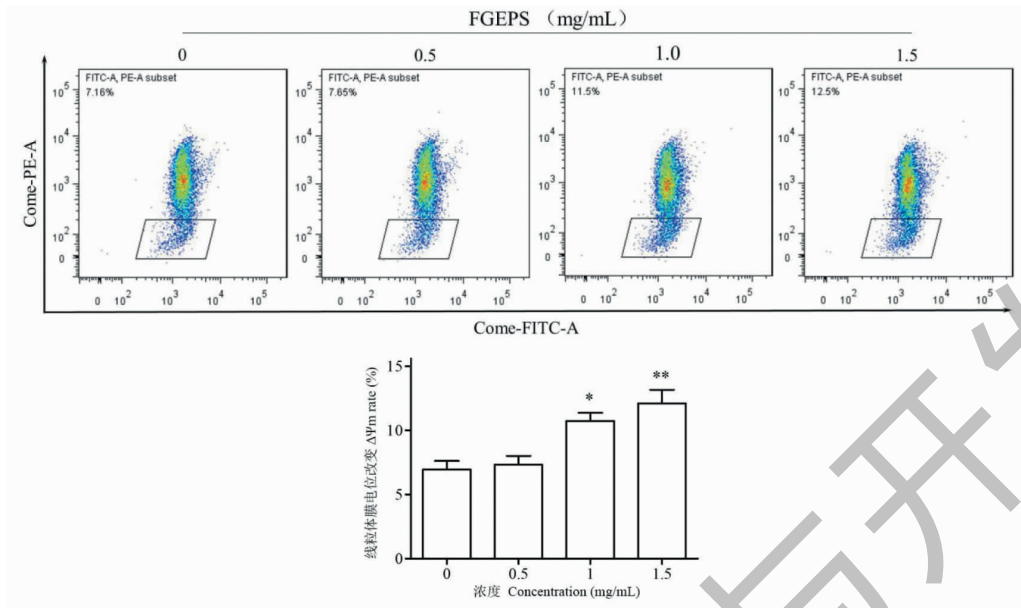


图8 FGEPS对SGC-7901细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of FGEPS on mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

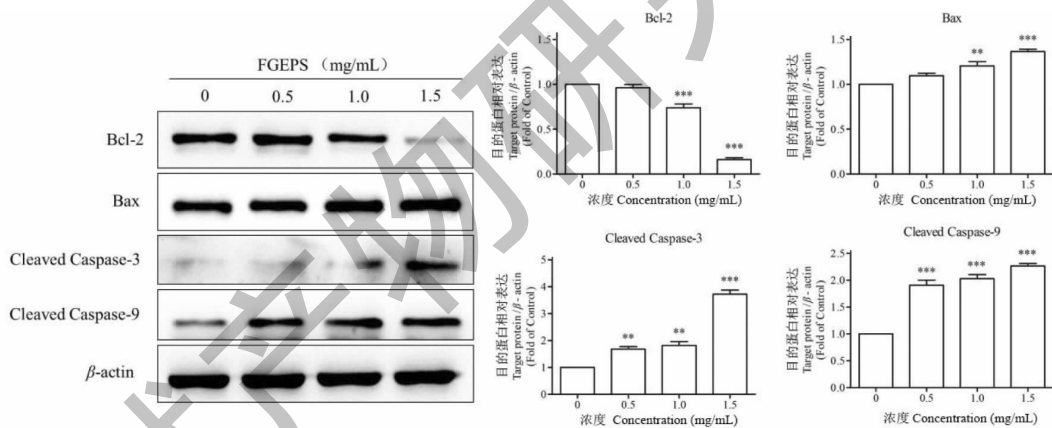


图9 FGEPS对SGC-7901细胞Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3及Cleaved Caspase-9蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of FGEPS on the expression of Bax, Bcl-2, Cleaved Caspase-3 and

Cleaved Caspase-9 proteins in SGC-7901 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

凋亡途径诱导 MCF-7 细胞凋亡^[23]; 苹果链格孢菌胞外多糖能够增加胃癌 BGC-823 细胞的活性氧水平,降低线粒体膜电位并形成凋亡小体^[9]。本研究中能够有效抑制人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的 FGEPS 正是从禾谷镰刀菌发酵液中分离得到, CCK-8 实验表明 FGEPS 能够有效抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖,细胞形态学结果表明 FGEPS 能够引起 SGC-7901 细胞收缩变形、胞膜发泡,甚至形成凋亡小体,而这些现象正是细胞凋亡的表现。AnexinV-

FITC/PI 双染、Hoechst 33258 染色及 JC-1 的染色结果表明 FGEPS 可诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡,并可能与线粒体介导的途径有关。由于细胞凋亡是由基因控制的细胞自身程序性死亡,涉及一系列基因的调控^[24],因此根据相关结果,我们研究了线粒体途径在 FGEPS 诱导 SGC-7901 细胞凋亡中的作用。

通过对引起凋亡作用机制的探讨,我们发现 FGEPS 能够显著上调促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 表达,并下调抑凋亡蛋

白 Bcl-2 蛋白表达,这显示线粒体途径介导的细胞凋亡与 FGEPS 发挥抗人胃癌 SGC-7901 作用关系密切。线粒体介导的细胞凋亡主要是指在凋亡信号的刺激下,抑凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白家族中 Bax 比率失衡,Bax 的过表达引起线粒体膜通透性增加,释放出 Cyt-C 等因子,在与凋亡蛋白酶活化因子结合后,能够激活凋亡蛋白酶 Caspase-9,促使半胱天冬氨酸与其结合,从而形成凋亡小体。Caspase 是一组庞大的凋亡蛋白酶家族,能够通过线粒体途径被激活,而活化的 Caspase 还能够引起线粒体释放出更多的 Cyt-C,该家族“瀑布式”的激活链将最终引起细胞走向凋亡。Caspase-9 处于“瀑布式”激活链的顶端,被激活后的 Caspase-9 将引起下游 Caspase-3 等效应分子的活化,引发 Caspase 级联反应,导致细胞核染色质固缩、裂解以及和胞体分离形成凋亡小体等^[25-27]。本研究发现 FGEPS 能够诱导 SGC-7901 细胞凋亡,且线粒体介导的细胞凋亡途径在 FGEPS 诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡过程中具有重要作用。多糖作为天然高分子物质,不只是结构、能量物质的基本成分,更是参与机体调控、应答的关键分子^[28-30]。随着糖生物学的发展,多糖因为具有良好的抗肿瘤活性而成为抗肿瘤药物的研究热点。

综上所述,本研究首次从禾谷镰刀菌中分离出胞外多糖 FGEPS,其对 SGC-7901、BGC-823 和 MGC-803 均有增殖抑制效果,且对 SGC-7901 抑制效果最为显著,并能通过线粒体通路诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡。实验为进一步探讨 FGEPS 抗胃癌作用的研究提供依据,为开发多糖类胃癌辅助治疗药物提供实验基础。

参考文献

- Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396: 635-648.
- Song Z, Wu Y, Yang J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. *Tumor Biol*, 2017, 39: 1010428317714626.
- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23: 700-713.
- Yu Y, Shen M, Song Q, et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 183: 91-101.
- Han Q. Critical problems stalling progress in natural bioactive polysaccharide research and development [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 4581-4583.
- Goodarzi N, Varshochian R, Kamalinia G, et al. A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92: 1280-1293.
- Sajadimajd S, Momtaz S, Haratipour P, et al. Molecular mechanisms underlying cancer preventive and therapeutic potential of algal polysaccharides [J]. *Curr Pharm Design*, 2019, 25: 1210-1235.
- Lyu F, Xu X, Zhang L. Natural polysaccharides with different conformations: extraction, structure and anti-tumor activity [J]. *J Mat Chem B*, 2020, 8: 9652-9667.
- Yuan P, Fang F, Shao T, et al. Structure and anti-tumor activities of exopolysaccharides from *Alternaria mali* roberts [J]. *Molecules*, 2019, 24 (7): 1345.
- Kazan K, Gardiner DM. Transcriptomics of cereal-*Fusarium graminearum* interactions: what we have learned so far [J]. *Mol Plant Pathol*, 2018, 19: 764-778.
- Lofgren LA, LeBlanc NR, Certano AK, et al. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? [J]. *New Phytol*, 2018, 217: 1203-1212.
- Yu W, Chen G, Zhang P, et al. Purification, partial characterization and antitumor effect of an exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 82: 299-307.
- Chen G, Zhang P, Huang T, et al. Polysaccharides from *Rhizopus nigricans* mycelia induced apoptosis and G2/M arrest in BGC-823 cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 97: 800-808.
- Yu Z, Kong M, Zhang P, et al. Immune-enhancing activity of extracellular polysaccharides isolated from *Rhizopus nigricans* [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 148: 318-325.
- Wang G, Zhu L, Yu B, et al. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 149: 112-120.
- Yang R, Meng D, Song Y, et al. Simultaneous decoloration and deproteinization of crude polysaccharide from pumpkin residues by cross-linked polystyrene macroporous resin [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60: 8450-8456.
- Sevag MG. The presence of a type- and species-specific conjugated polysaccharide in type I pneumococcus [J]. *Science*, 1938, 87 (2257): 304-305.
- Li Q, Wu D, Zhou S, et al. Structure elucidation of a bioactive polysaccharide from fruiting bodies of *Hericium erinaceus* in different maturation stages [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 144: 196-204.
- Mazumder A, Cerella C, Diederich M. Natural scaffolds in anticancer therapy and precision medicine [J]. *Biotechnol Adv*,

- 2018,36:1563-1585.
- 20 Ziemska J, Szynal T, Mazanska M, et al. Natural medicinal resources and their therapeutic applications[J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*,2019,70:407-413.
- 21 Cragg GM, Newman DJ. Natural products;a continuing source of novel drug leads [J]. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*, 2013,1830:3670-3695.
- 22 Elmore S. Apoptosis;a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*,2007,35:495-516.
- 23 Lu Y, Zhang X, Wang J, et al. Exopolysaccharides isolated from *Rhizopus nigricans* induced colon cancer cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* via activating the AMPK pathway [J]. *Biosci Rep*,2020,40(1):BSR20192774.
- 24 Wang G, Liu C, Liu J, et al. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces the apoptosis of MCF-7 cells through an intrinsic mitochondrial pathway [J]. *Carbohydr Polym*,2016,136:1065-1073.
- 25 Vallette F. Generalities on the molecular mechanisms of apoptosis [J]. *Rev Neurol*,2001,157:453-459.
- 26 Adamczyk M, Kostka G, Palut D. The role of apoptosis in cell physiology and pathology [J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 1998,49:415-432.
- 27 D'Arcy MS. Cell death;a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*,2019,43:582-592.
- 28 Zhang Y, Jiang Y, Zhang M, et al. *Ganoderma sinense* polysaccharide:an adjunctive drug used for cancer treatment [J]. *Prog Molec Biol Transl Sci*,2019,163:165-177.
- 29 Sun Y, Jing X, Ma X, et al. Versatile types of polysaccharide-based drug delivery systems;from strategic design to cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(23):9159.
- 30 Silva AKA, Letourneur D, Chauvierre C. Polysaccharide nanosystems for future progress in cardiovascular pathologies [J]. *Theranostics*,2014,4:579-591.

(上接第 1233 页)

- 19 Zhou Y, Pang B, Xiao YB, et al. The protective microRNA-199a-5p-mediated unfolded protein response in hypoxic cardiomyocytes is regulated by STAT3 pathway [J]. *J Physiol Biochem*,2019,75(1):73-81.
- 20 Peng H, Liu YL, Hu XH, et al. Role of signal transducers and activations and transcription 3 regulated by astragalus roots in viral myocarditis [J]. *J Applied Clin Pediatr(实用儿科临床杂志)*,2005,20(3):218-220.
- 21 Liu TW, Wu WF, Feng ZB, et al. Effects of astragalus on apoptosis and Fas/FasL gene transcription in the development virus myocarditis in mice [J]. *South Chin J Cardiovascular Dis(岭南心血管病杂志)*,2003,9:430-433.
- 22 Qi GB, Gao JB. Effects of Astragalus injection on miR and Treg/Th17 cytokines in patients with viral myocarditis [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*,2019,42:924-927.
- 23 Zhou X, Liu CM, Hu AN, et al. Effects of astragaloside IV on TLR4, NF- κ B and TNF- α expression in mice with viral myocarditis [J]. *Chin J Clin(中华临床医师杂志)*,2012,6:3659-3662.
- 24 Zhong ZC, Yang YZ, Li SJ, et al. Effect of astragaloside on myocardial fibrosis in viral myocarditic mice [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*,2003,22:515-519.