

灵芝多糖调控抗氧化因子表达抑制乳腺癌恶性表型研究

潘云霞¹, 焦卓亚¹, 彭 灿^{2,4,5}, 宋 航^{1,3}, 刘俊卿¹, 陈峰远^{1,3*}

1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012
2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
3. 安徽省中医药科学院中西医结合研究所, 安徽 合肥 230012
4. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012
5. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 研究灵芝多糖对乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞凋亡的影响及作用机制。方法 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞分别给予灵芝多糖 (25、50、75 mg/mL) 干预后, MTS 法检测灵芝多糖对乳腺癌细胞增殖的影响; TUNEL 染色及流式细胞术探测灵芝多糖对乳腺癌细胞凋亡的影响; 采用流式细胞术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 检测细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平; 采用 qRT-PCR 技术检测抗氧化相关基因谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基 (glutamate-cysteine ligase regulatory subunit, *GCLM*)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, *GCLC*)、人硫氧还蛋白还原酶 1 (human thioredoxin reductase 1, *TXNRD1*)、苹果酸酶 1 (malic enzyme 1, *ME1*)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, *TXN*) mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测 *GCLM*、*TXNRD1* 蛋白表达。结果 给予灵芝多糖干预后, MCF-7、MDA-MB-231 细胞活性明显降低 ($P < 0.01$), 凋亡率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), GSH 水平明显下降 ($P < 0.01$); 抗氧化因子 mRNA 及蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 灵芝多糖能够通过抑制 *GCLM* 等抗氧化基因表达诱导 ROS 生成, 促进乳腺癌细胞凋亡, 进而抑制乳腺癌恶性进展。

关键词: 灵芝多糖; 乳腺癌; 活性氧; 谷胱甘肽; 谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7440-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.014

Ganoderma lucidum polysaccharide inhibits malignant phenotype of breast cancer via regulation of antioxidant factor expressions

PAN Yun-xia¹, JIAO Zhuo-ya¹, PENG Can^{2,4,5}, SONG Hang^{1,3}, LIU Jun-qing¹, CHEN Feng-yuan^{1,3}

1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
3. Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
4. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei 230012, China
5. MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) on apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. **Methods** MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells were treated with GLP (25, 50, 75 mg/mL), MTS method was used to detect the effect of GLP on the proliferation of breast cancer cells; TUNEL staining and flow cytometry were used to detect the effect of GLP on apoptosis of breast cancer cells; The level of reactive oxygen species (ROS) in cells was detected by flow cytometry; The intracellular glutathione (GSH) level was detected; The mRNA expressions of antioxidant related genes glutamate

收稿日期: 2022-08-26

基金项目: 安徽省教育厅重点研究项目 (KJ2021A0603); 安徽省留学回国人员创新创业扶持计划 (2020LXC009); 安徽中医药大学青年科技英才培育项目 (2021qnyc03); 安徽省重点实验室开放课题 (KFZZ202205); 安徽高校协同创新项目 (GXXT-2020-025); 安徽省科技重大专项 (202103a07020001); 大学生创新创业训练计划 (S202110369084)

作者简介: 潘云霞 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治肿瘤。Tel: 15855192321 E-mail: yunxiapan@sina.com

*通信作者: 陈峰远 (1989—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中医药防治肿瘤。Tel: 19810698616 E-mail: isobellachen@163.com

cysteine ligase regulatory subunit (*GCLM*), glutamate cysteine ligase catalytic subunit (*GCLC*), human thioredoxin reductase 1 (*TXNRD1*), malic enzyme 1 (*ME1*) and thioredoxin (*TXN*) were detected by qRT-PCR technique; Western blotting was used to detect the expressions of *GCLM* and *TXNRD1* proteins. **Results** After GLP intervention, activities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells were significantly decreased ($P < 0.01$), apoptosis rate was increased ($P < 0.05, 0.01$), intracellular ROS level was increased ($P < 0.05, 0.01$), and GSH level was decreased ($P < 0.01$); mRNA and protein expressions of antioxidant factors were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** GLP can induce ROS production by inhibiting the expression of antioxidant genes such as *GCLM*, promote the apoptosis of breast cancer cells, and then inhibit the malignant progress of breast cancer.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharide; breast cancer; reactive oxygen species; glutathione; glutamate-cysteine ligase regulatory subunit

灵芝是一种多孔菌科真菌的子实体，为我国传统著名中药，被誉为“仙草”。其味甘，性平，归心、肺、肝、肾经，具有益气活血、扶正补虚之功效。灵芝主要活性成分为三萜类和多糖类化合物，此外还含有核苷酸、生物碱、甾醇、脂肪酸、多肽以及微量元素等。灵芝多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗炎、神经保护作用等多种药理活性^[1]。灵芝多糖可通过提高机体免疫力、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞转移等多种调控机制发挥抗肿瘤的功​​效^[2]。

乳腺癌在《神农本草经》普济方中称为乳岩、石痈、翻花等^[3]。中医认为气滞血瘀、痰凝毒结为乳腺癌发病之本，因此灵芝益气活血、扶正补虚治法符合乳腺癌根本治法。2020 年乳腺癌新发病例数高达 226 万，超过肺癌，已成为全球发病率最高的恶性肿瘤^[4]。尽管医疗水平的提升延长患者的生存时间，但是治疗引起的性功能障碍和疼痛等一系列问题仍造成患者生活质量下降。此外晚期乳腺癌患者 5 年生存率仅为 20%。因此深入了解乳腺癌发生发展及转移的分子机制，为乳腺癌治疗、药物研发和诊断监测提供科学依据和新思路，具有重要的临床意义。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成与乳腺癌发生发展以及转移等密切相关。研究发现，低水平的 ROS 可通过诱导基因突变、激活多条信号通路促进肿瘤发生发展^[5]；而高浓度的 ROS 堆积可导致线粒体功能损伤，诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。与正常细胞相比，肿瘤细胞内 ROS 水平增加，因此肿瘤细胞对异常增高的 ROS 更为敏感。冬凌草甲素^[7]、松萝酸^[8]等可通过诱导 ROS 生成诱导乳腺癌细胞凋亡。但灵芝多糖调控乳腺癌细胞氧化应激的功能及作用机制并不明确。因此本研究以人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株为研究对象，采用流式细胞术、Western blotting、qRT-PCR 等分子生物学技

术考察灵芝多糖在乳腺癌氧化应激中的调控功能及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞

MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 (批号分别为 SCSP-5043、SCSP-531) 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药品与试剂

胎牛血清 (批号 04-001-1ACS)、RPMI 1640 培养基 (批号 2134234) 购自以色列 BI 公司；DMEM 培养基 (批号 SH30022.01) 购自 Hyclone 公司；青霉素-链霉素 (批号 C0222)、Annexin V-FITC 试剂盒 (批号 C1062M)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (批号 S0052)；RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司；灵芝多糖 (批号 BCSW210324-1, 质量分数为 80%) 购自西安百川生物科技有限公司；MTS 细胞增殖试剂盒 (批号 G3580) 购自 Progema 公司；4%多聚甲醛 (批号 1912A05)、化学发光试剂盒 (批号 BL520A) 购自 Biosharp 公司；TUNEL 染色试剂盒 (批号 7E521C1)；逆转录试剂盒 (批号 R232-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；H2DCFDA 试剂 (批号 D399) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；SYBR (批号 MPC2201032) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司；Trizol (批号 15596026)、ProLong™ Diamond 抗淬灭封片剂 (含 DAPI, 批号 P36971) 购自 Invitrogen 公司；谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基 (glutamate-cysteine ligase regulatory subunit, *GCLM*)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, *GCLC*)、人硫氧还蛋白还原酶 1 (human thioredoxin reductase 1, *TXNRD1*)、苹果酸酶 1 (malic enzyme 1, *ME1*)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, *TXN*)、 β -actin 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成； β -actin 抗

体(批号 3700S)、二抗(批号 14709S)购自美国 CST 公司; GCLM 抗体(批号 EPR6667)、TXNRD 抗体(批号 EPNCIR129)购自英国 Abcam 公司。

1.3 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); FACSCelesta 流式细胞仪(美国 BD 公司); 1645070 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Light Cycler96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的 DMEM 或 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 细胞增殖实验

取对数生长期的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 5×10³ 个/mL 接种于 96 孔板, 100 μL/孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养过夜。灵芝多糖用 DMEM 培养基分别配制成 20、40、80、120 mg/mL 的溶液, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。弃去培养基, PBS 清洗后, 每孔加入 100 μL 1×MTS 试剂, 于培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值, 计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀), 筛选后续实验剂量。

2.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡

在 24 孔板内放入细胞爬片, MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 5×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板, 置于培养箱中培养过夜。分别加入不同浓度(25、50、75 mg/mL)的灵芝多糖, 另设置对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗, 加入 4%多聚甲醛, 室温静置 20 min, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min。随后每孔加入 0.2 mL 0.5% Triton-X100, 室温静置 10 min, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min, 采用 TUNEL 染色试剂盒对细胞进行染色, PBS 清洗 2 次, 每次 5 min。取出爬片, 以抗淬灭封片剂封片, 于荧光倒置显微镜下观察并拍照, 使用 LAS AF Lite 软件处理, 计算凋亡率。

凋亡率 = TUNEL 阳性细胞/DAPI 阳性细胞

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 3×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中, 置于培养箱中培养过夜。按

“2.3”项下方法进行分组和给药, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗后, 加入不含 EDTA 的胰酶进行消化, 待消化完全后, 加入培养基终止消化, 收集细胞, 细胞计数后取 5×10⁴ 个细胞, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞并置于流式管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 加入 10 μL 碘化丙啶(PI), 轻轻混匀, 避光冰浴 20 min, 随后上机检测, 采用 FlowJo 软件分析细胞凋亡情况。

2.5 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 3×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中, 培养过夜。按“2.3”项下方法进行分组和给药, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗 2 次, 加入 500 μL 培养基(含 0.2 μL H2DCFDA), 置于培养箱中避光培养 30 min。胰酶消化后收集细胞, PBS 重悬后, 随后上机检测, 采用 FlowJo 软件分析细胞内 ROS 水平。

2.6 细胞内 GSH 水平检测

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 3×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板, 置于培养箱中培养过夜。按“2.3”项下方法进行分组和给药, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗, 胰酶消化后收集细胞, 细胞计数。按试剂盒说明书测定细胞内 GSH 水平。

2.7 qRT-PCR 检测 GCLM、GCLC、TXNRD1、ME1 和 TXN mRNA 表达

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 3×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板, 置于培养箱中培养过夜。按“2.3”项下方法进行分组和给药, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗后, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>β-actin</i>	F: CGAGCGCGGCTACAGCTT R: TCCTTAATGTCACGCACGATTT
<i>GCLC</i>	F: GTGGTACTGCTCACCAGAGTG R: CGGTTCAGGATAAACTGTGGCTG
<i>GCLM</i>	F: ATCTTGCCCTCTGCTGTGTGATGC R: CAATGACCGAATACCGCAGTAGCC
<i>TXNRD1</i>	F: GCAATCCAGGCAGGAAGATTGCT R: CTCTTGACGGAATCGTCCATTCC
<i>ME1</i>	F: CCTCACTACTGCTGAGGTTATAGC R: CGGTTCAGGATAAACTGTGGCTG
<i>TXN</i>	F: CTTGGACGCTGCAGGTGATA R: TCTGAAGCAACATCCTGACAGT

2.8 Western blotting 检测 TXNRD1 和 GCLM 蛋白表达

MCF-7、MDA-MB-231 细胞分别以 3×10^5 个/孔接种于 12 孔板, 置于培养箱中培养过夜。按“2.3”项下方法进行分组和给药, 培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗后, 用细胞刮刮取细胞, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、3600 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS。加入 RIPA 裂解液, 于冰上裂解细胞 30 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 分别加入 β -actin 抗体 (1:5000)、GCLM 抗体 (1:1500)、TXNRD 抗体 (1:1500), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜; 以 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h 后, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入化学发光试剂显影, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

使用 Microsoft Office Excel、Graphpad Prism 8.0

软件处理数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用单因素方差分析检验。

3 结果

3.1 灵芝多糖抑制乳腺癌细胞增殖

MCF-7 细胞 IC_{50} 为 45.17 mg/mL, MDA-MB-231 细胞 IC_{50} 为 55.74 mg/mL, 2 种细胞的 IC_{50} 接近 50 mg/mL, 因此取 50 mg/mL 作为后续实验的基础。将 IC_{50} 的 50%、100%、150% 作为实验的低、中、高剂量, 即分别以 25、50、75 mg/mL 灵芝多糖进行后续研究。如图 1-A、B 所示, 灵芝多糖显著抑制乳腺癌细胞增殖 ($P < 0.01$)。如图 1-C、D 所示, 灵芝多糖显著诱导乳腺癌细胞凋亡 ($P < 0.01$)。流式细胞术检测结果 (图 2) 显示, 给予灵芝多糖后, 乳腺癌细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 且呈剂量相关性。

3.2 灵芝多糖诱导乳腺癌细胞内 ROS 生成

如图 3 所示, 灵芝多糖显著诱导乳腺癌细胞内 ROS 生成 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明灵芝多糖可能通过诱导乳腺癌细胞 ROS 生成促进细胞凋亡。

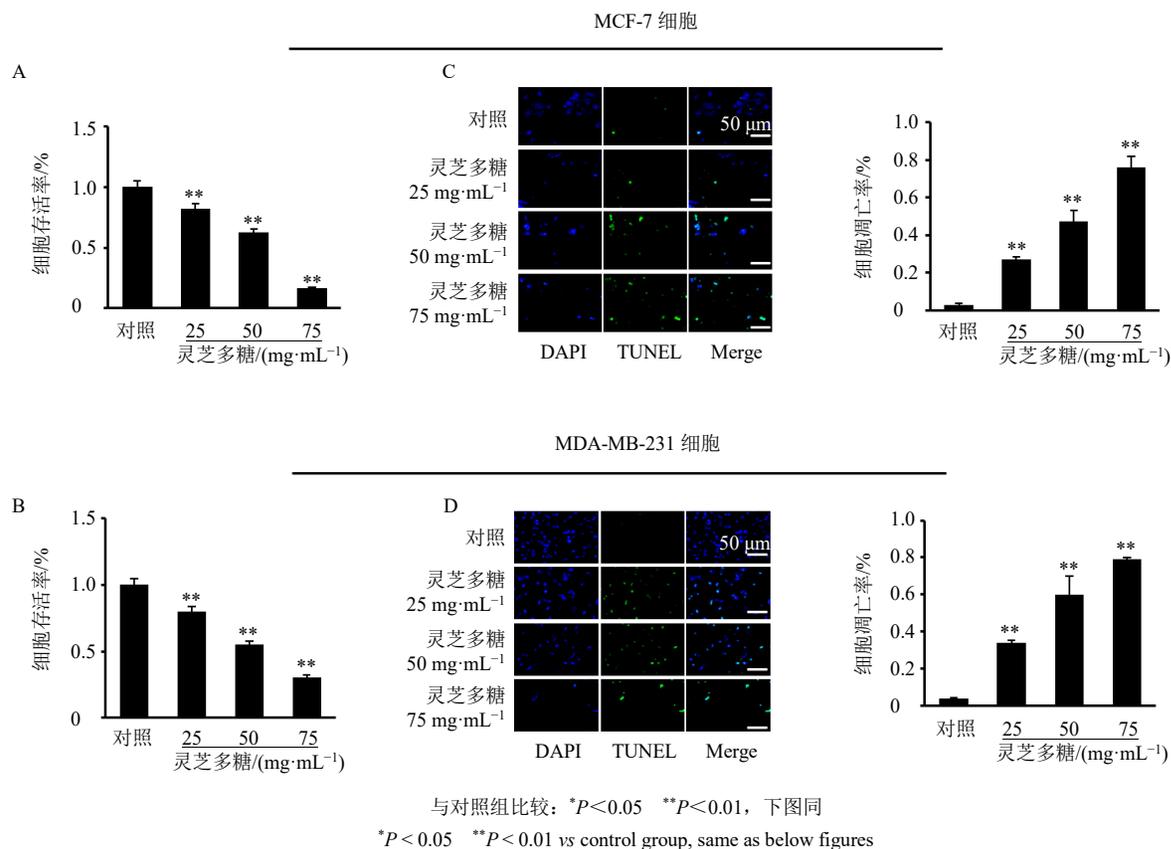


图 1 灵芝多糖抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖 (A、B) 并诱导其凋亡 (C、D) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibited proliferation (A, B) and promoted apoptosis (C, D) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

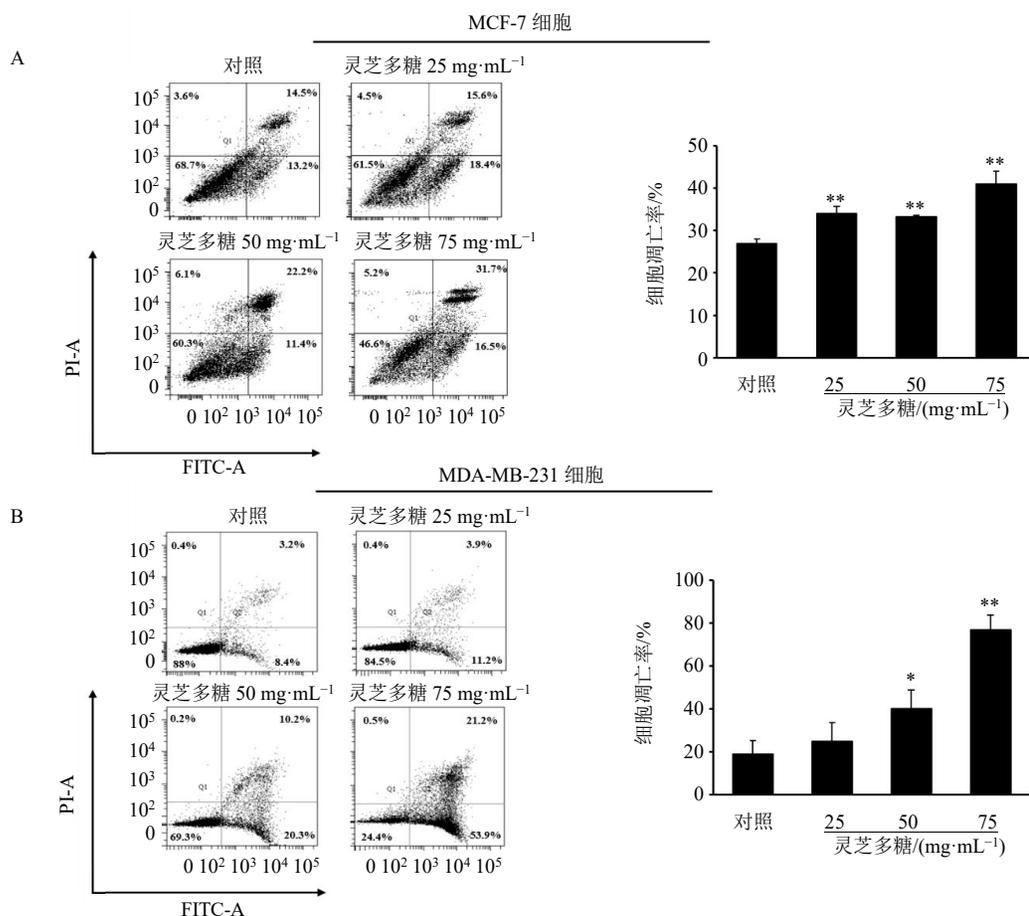


图 2 灵芝多糖促进 MCF-7 (A) 和 MDA-MB-231 (B) 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 *Ganoderma lucidum* polysaccharide promoted apoptosis of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

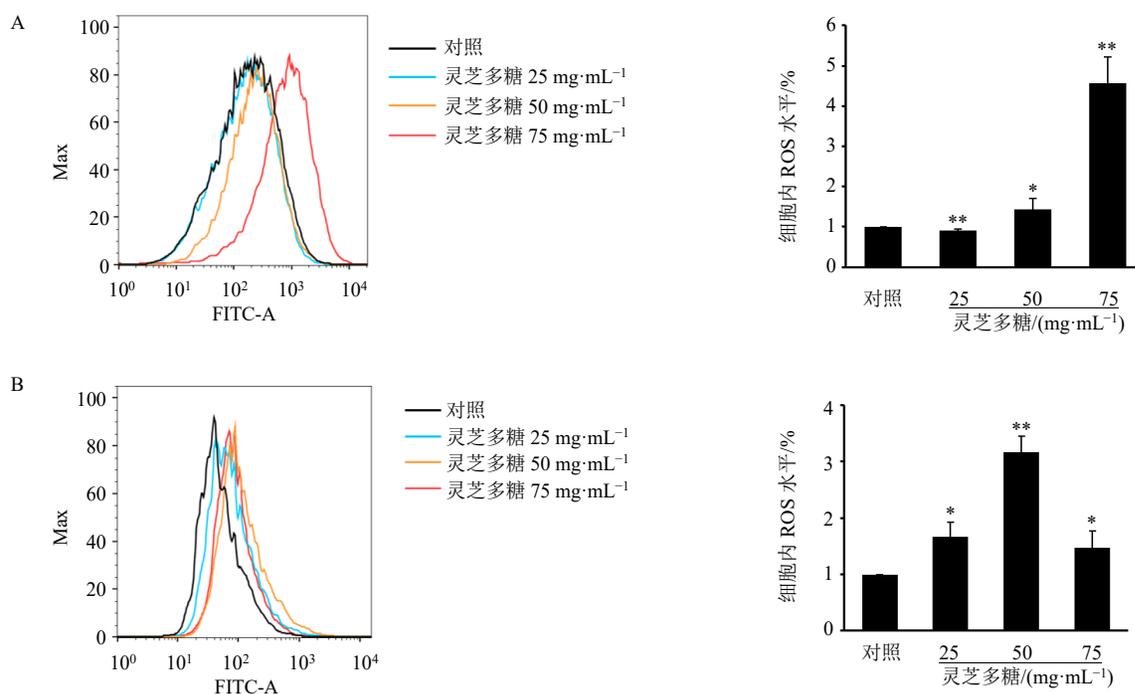


图 3 灵芝多糖诱导 MCF-7 (A) 和 MDA-MB-231 (B) 细胞内 ROS 生成 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 *Ganoderma lucidum* polysaccharide promoted ROS generation of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 灵芝多糖抑制乳腺癌细胞内 GSH 水平

GSH 是广泛存在于生物体内的生物活性非蛋白硫醇化合物。研究表明,肿瘤细胞 GSH 水平升高可及时清除过多的 ROS, 避免细胞发生凋亡^[9]。推测灵芝多糖是否通过抑制 GSH 合成诱导乳腺癌细胞 ROS 生成。如图 4 所示, 灵芝多糖显著抑制乳腺癌细胞内 GSH 合成 ($P < 0.01$)。

3.4 灵芝多糖抑制抗氧化因子基因和蛋白表达

为了进一步探究灵芝多糖抑制 GSH 合成的作用机制, 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞抗氧化因子的基因及蛋白表达进行检测。如图 5、6 所示, 灵

芝多糖显著抑制 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞 *GCLM*、*GCLC*、*TXNRD1* 和 *ME1* mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著抑制 MCF-7 细胞 *TXN* mRNA 表达 ($P < 0.05$), 而灵芝多糖高剂量组 MDA-MB-231 细胞中 *TXN* mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$)。Western blotting 实验也证实灵芝多糖可显著抑制 GSH 合成关键酶 GCLM 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。TXNRD 可以通过活性中心二硫醇可逆氧化成二硫化物, 作为氧化还原反应中的氢供体, 发挥抗氧化功能。结果显示, 灵芝多糖可显著抑制 TXNRD 蛋白表达 ($P < 0.01$)。

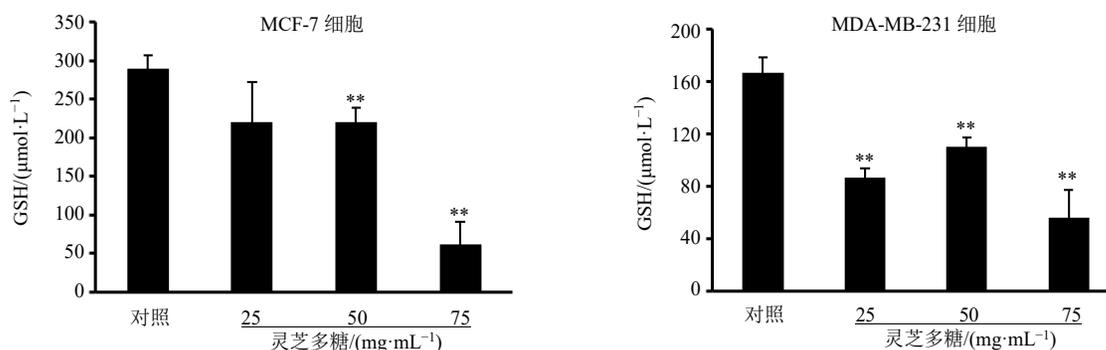


图 4 灵芝多糖抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞内 GSH 合成 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibited GSH synthesis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

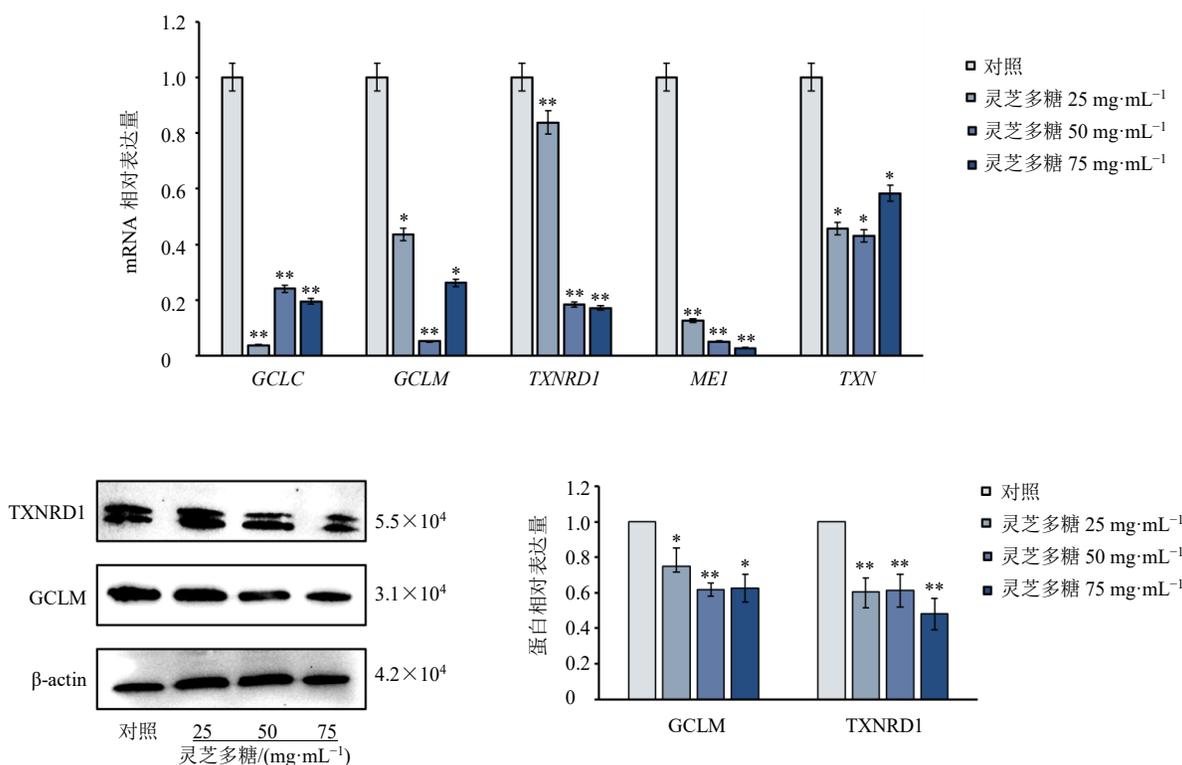


图 5 灵芝多糖抑制 MCF-7 细胞抗氧化相关因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibited expressions of antioxidant-related factors in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

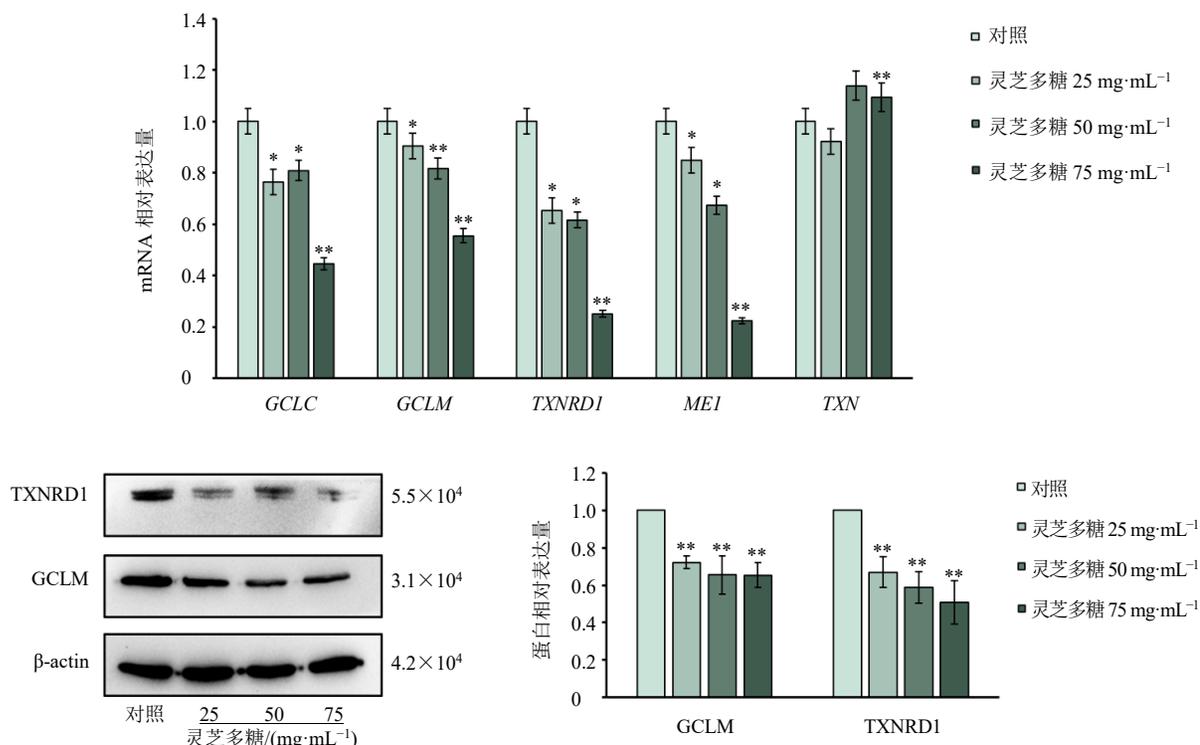


图 6 灵芝多糖抑制 MDA-MB-231 细胞抗氧化相关因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *Ganoderma lucidum* polysaccharide inhibited expressions of antioxidant-related factors in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

2020 年我国乳腺癌新发病例约 33.2 万，发病病例高居全球第 1 位；死亡人数约为 11.7 万，位居女性恶性肿瘤死亡首位^[10]。在过去 10 年，乳腺癌的预防、诊断和治疗方面取得了重大进展^[11]。目前乳腺癌的治疗选择包括手术干预、放疗、新化疗和辅助化疗、激素疗法或分子靶向疗法，可根据患者的身体状况和癌症状态，制定个性化治疗方案^[12]。尽管这些治疗延长了患者的生存周期，但是晚期乳腺癌患者死亡率高。与此同时，三阴性乳腺癌具有恶性度高、侵袭性强、预后差等特征，患者对内分泌治疗和靶向治疗不敏感。因此进一步研究乳腺癌恶性进展分子机制，寻求一种不良反应小的辅助治疗方法具有重要意义。

灵芝被誉为“仙草”“瑞草”，是我国传统著名中药。灵芝具有增强机体免疫力、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用^[13]，灵芝多糖是灵芝的主要成分，可抑制结肠癌^[14]、肺癌^[15]、前列腺癌^[16]、肝癌^[17]等多种恶性肿瘤发生发展。研究显示，灵芝多糖通过诱导 *miR-125b* 表达抑制调节性 T 细胞功能，进而抑制肝癌发生发展^[17]；灵芝多糖可通过改善肠道菌群，激活腹膜巨噬细胞吞噬功能，促进自噬体形成

抑制结肠癌恶性进展^[14]；灵芝水提取物通过抑制尿激酶型纤溶酶原激活物（urokinase type plasminogen activator, uPA）、核因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）活性，抑制 MDA-MB-231 细胞增殖与迁移^[18]；灵芝孢子多糖与紫杉醇联合用药可通过调控肿瘤代谢、增强机体免疫力、改善肠道菌群失调，从而显示出更好的抗乳腺癌活性^[19]。本研究通过 MTS 增殖法、TUNEL 染色及 Annexin V-FITC 双染确定灵芝多糖可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导乳腺癌细胞凋亡。

ROS 是细胞线粒体电子传递链产生的性质活泼的含氧物质。因线粒体功能障碍、代谢改变、基因突变，癌细胞中 ROS 产量明显增加^[20]。适度提高 ROS 的水平可激活 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）、细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase, ERK）、Janus 激酶（Janus kinase, JAK）/信号转导及转录激活因子（signal transducer and activator of transcription, STAT）等多条信号通路促进肿瘤细胞增殖^[21]，可通过抑制缺氧诱导因子-1 α （hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α ）蛋白降解促进肿瘤细胞侵袭^[22]。然而，过度的 ROS 积累可导致大分子物质氧化损伤，从而引起细胞死亡^[23]。补骨脂乙素、冬

凌草甲素等能够通过诱导乳腺癌细胞内 ROS 升高诱导细胞凋亡，抑制细胞增殖，进而发挥抗肿瘤作用^[7,24]。灵芝提取物可通过促进前列腺癌 PC-3 细胞 ROS 生成诱导前列腺癌细胞凋亡^[16]。本研究以 H2DCFDA 为细胞内 ROS 探针，发现灵芝多糖可升高 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞内 ROS 水平。MCF-7 细胞中，灵芝多糖高剂量组 ROS 水平最高；而 MDA-MB-231 细胞中，灵芝多糖中剂量组 ROS 水平最高，其原因可能为①凋亡影响：流式结果中，对于 MCF-7 细胞，灵芝多糖高剂量组细胞凋亡率约为 41%；而对于 MDA-MB-231 细胞，灵芝多糖高剂量组细胞凋亡率约为 76.7%；相较于 MCF-7 细胞，灵芝多糖高剂量组 MDA-MB-231 细胞凋亡率更高。H2DCFDA 为探针检测 ROS 主要针对活细胞，由于灵芝多糖高剂量组 MDA-MB-231 细胞凋亡率过高，因此灵芝多糖中剂量组 MDA-MB-231 细胞内 ROS 水平最高。②细胞背景不同：MCF-7 细胞是雌激素受体阳性乳腺癌细胞（ER+，野生型 p53），MDA-MB-231 细胞是三阴性乳腺癌细胞（ER-，突变型 p53），由于细胞背景及代谢不同，也可能导致此差异。

由于肿瘤细胞具有高负荷的 ROS 特征，其细胞进化出多种防御机制降低 ROS 的不利影响，其中一种重要机制是激活抗氧化系统。抗氧化系统主要有 2 类，第 1 类是抗氧化酶类，包括超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、过氧化氢酶（catalase, CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px）等，第 2 类是含巯基的小分子蛋白质，包括硫氧还蛋白（thioredoxin, Trx）和 GSH 等。GSH 是一种由 L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸组成的三肽。GSH 是由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸在胞质中通过两步反应合成，第 1 步反应是由 GCLC 和催化亚基 GCLM 催化下形成 γ -谷氨酰半胱氨酸；第二步反应是谷胱甘肽合成酶将甘氨酸添加到 γ -谷氨酰半胱氨酸中并产生 GSH。其中 GCLM 是 GSH 合成关键限速酶^[25]。研究显示，HIF-1 可在缺氧条件下激活 GCL 表达和促进 GSH 合成，从而促进化疗后乳腺癌干细胞增殖^[26]。本研究发现灵芝多糖可抑制 MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞内 GSH 生成，推测灵芝多糖通过抑制 GSH 生成诱导乳腺癌细胞 ROS 生成。结果显示，MDA-MB-231 细胞中，灵芝多糖中剂量组 GSH 水平高于低剂量组，推测可能是由于癌细胞除合成 GSH 等含巯基的小分

子物质，还可通过表达抗氧化酶消除 ROS 所带来的不利影响，因此低剂量的灵芝多糖在 MDA-MB-231 细胞中可能通过其他保护机制减少氧化应激损伤。MDA-MB-231 细胞中，灵芝多糖中剂量组 GCLM、GCLC 等 mRNA 与蛋白表达水平均高于高剂量组；GCLM 与 GCLC 为谷胱甘肽生物合成过程的限速酶，因此灵芝多糖中剂量组细胞内 GSH 水平显著高于高剂量组。

作为 GSH 合成关键限速酶的修饰亚基，GCLM 在肿瘤发生发展有着重要作用。GCLM 缺失导致乳腺癌小鼠模型中的肿瘤延迟发病^[25]；此外，GCLM 高表达与非小细胞肺癌的治疗抗性有关^[27]。Western blotting 及 qRT-PCR 结果显示，灵芝多糖可通过抑制 TXNRD1、GCLM 多种抗氧化因子表达抑制 GSH 生成，进而诱导细胞内 ROS 生成。推测灵芝多糖可能通过抑制多种抗氧化基因表达诱导 ROS 生成，从而诱导乳腺癌细胞凋亡，进而抑制乳腺癌恶性进展（图 7）。

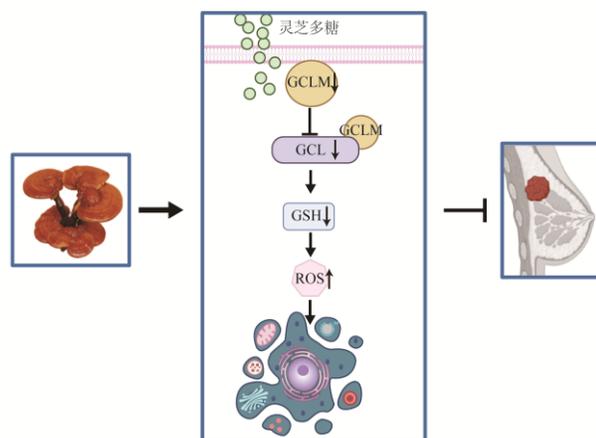


图 7 灵芝多糖诱导乳腺癌细胞凋亡的作用机制

Fig. 7 Mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharide inducing apoptosis of breast cancer cells

综上所述，本研究初步探讨了灵芝多糖在乳腺癌氧化应激中的功能及其相关分子机制，验证了灵芝多糖通过抑制 GCLM 抑制 GSH 合成，从而诱导 ROS 在细胞内大量累积，最终诱导乳腺癌 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞凋亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 谢溢坤, 张静, 余茜, 等. 灵芝多糖类成分及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(17): 5414-5429.
 [2] Ahmad M F. *Ganoderma lucidum*: A rational pharmacological approach to surmount cancer [J]. J

- Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113047.
- [3] 宋·陈自明原著, 明·薛己校注, 许润三注释. 《校注妇人良方》注释 [M]. 南昌: 江西人民出版社, 1983: 449-450.
- [4] 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.
- [5] Cheung E C, Vousden K H. The role of ROS in tumour development and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(5): 280-297.
- [6] Gorrini C, Harris I S, Mak T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947.
- [7] Zhao Y, Xiao W W, Peng W Q, *et al*. Oridonin-loaded nanoparticles inhibit breast cancer progression through regulation of ROS-related Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 600579.
- [8] 左舒婷. 松萝酸通过 ROS 诱导乳腺癌细胞凋亡机制的实验研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [9] Niu B Y, Liao K X, Zhou Y X, *et al*. Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy [J]. *Biomaterials*, 2021, 277: 121110.
- [10] 闵淑慧, 胡依, 郭芮琦, 等. 1990—2019 年中国女性乳腺癌疾病负担及变化趋势分析 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(16): 2941-2945.
- [11] DiNardo D, McNeil M A. Update in breast cancer screening, prevention, and treatment [J]. *J Womens Health*, 2021, 30(8): 1074-1077.
- [12] Fan L, Strasser-Weippl K, Li J J, *et al*. Breast cancer in China [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
- [13] 方雅玲, 张玉琴, 吴长辉, 等. 灵芝孢子油、破壁灵芝孢子粉及灵芝孢子提取物对小鼠急性胃溃疡的保护作用 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(2): 308-313.
- [14] Guo C L, Guo D 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.
- [15] 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.
- [16] Wu K K, Na K, Chen D, *et al*. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 on *Ganoderma lucidum* polysaccharides-induced apoptosis of human prostate cancer PC-3 cells [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(6): 2356-2368.
- [17] Li A M, Shuai X Y, Jia Z J, *et al*. *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract inhibits hepatocellular carcinoma growth by downregulating regulatory T cells accumulation and function by inducing microRNA-125b [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 100.
- [18] Sliva D, Labarrere C, Slivova V, *et al*. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(4): 603-612.
- [19] Li D, Gao L, Li M X, *et al*. Polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum* ameliorates paclitaxel-induced intestinal barrier injury: Apoptosis inhibition by reversing microtubule polymerization [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110539.
- [20] Moloney J N, Cotter T G. ROS signalling in the biology of cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 50-64.
- [21] Shi Y, Xu S F, Ngoi N Y L, *et al*. PRL-3 dephosphorylates p38 MAPK to promote cell survival under stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 177: 72-87.
- [22] Wang Y W, Qi H, Liu Y, *et al*. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy [J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4839-4857.
- [23] 牟伊, 文帅, 高新星, 等. 基于活性氧调控的抗肿瘤药物研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(7): 1453-1465.
- [24] 张玉心, 高美佳, 朱美林, 等. 补骨脂乙素通过多途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞死亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(6): 878-885.
- [25] Lu S C. Regulation of glutathione synthesis [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1/2): 42-59.
- [26] Lu H Q, Samanta D, Xiang L S, *et al*. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(33): E4600-E4609.
- [27] Fujimori S, Abe Y, Nishi M, *et al*. The subunits of glutamate cysteine ligase enhance cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(2): 413-418.

[责任编辑 李亚楠]