

高能 X 线和人参皂甙 Rb₁ 对人脑胶质瘤细胞 SHG-44 的影响

闫 静¹, 何 侠¹, 赵洪瑜², 仇晓军², 王 燕², 陈晓珏², 季 斌²

(1. 江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009; 2. 南通大学附属医院, 江苏 南通 226001)

摘 要: [目的] 探讨高能 X 线和人参皂甙 Rb₁ 对人脑胶质瘤细胞株 SHG-44 的影响。[方法] 应用 MTT 法检测细胞增殖情况; 流式细胞仪检测细胞周期的变化; RT-PCR 法检测 *MMP-2*、*MMP-9* mRNA 的表达水平。[结果] 高能 X 线照射后 SHG-44 细胞增殖受到抑制, 且随照射剂量加大抑制作用增强。当加入人参皂甙 Rb₁ 后, 细胞增殖抑制更加明显; 高能 X 线照射后 SHG-44 细胞表现为 G₂/M 期阻滞, 而人参皂甙 Rb₁ 可缓解 G₂/M 期阻滞现象; 辐射促进 *MMP-2*、*MMP-9* 的表达, 且随照射剂量的增加表达量增加, 而人参皂甙 Rb₁ 抑制其表达, 与药物浓度呈反比。[结论] 人参皂甙 Rb₁ 与高能 X 线协同抑制 SHG-44 的增殖, 辐射后肿瘤细胞侵袭能力增强, 而人参皂甙 Rb₁ 使照射后肿瘤细胞侵袭能力下降。

关键词: 高能 X 线; 人参皂甙 Rb₁; 胶质细胞瘤; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)04-266-04

Effects of High Energy X-ray and Ginsenoside Rb₁ on Human Glioma SHG-44 Cell

WEN Jing¹, HE Xia¹, ZHAO Hong-yu², et al.

(1. Jiangsu Provincial Cancer Hospital, Nanjing 210009, China; 2. Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of high energy X-ray and ginsenoside Rb₁ on human glioma SHG-44 cell line. [Methods] MTT method was applied to detect the cell proliferation conditions. Flow cytometry was applied to observe the change of cell cycle. The expressions of *MMP-2* and *MMP-9* mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). [Results] The SHG-44 cell proliferation was inhibited after 12h of radiation, which boosted with the increasing of radiation dose. The inhibition of proliferation was more obvious when adding ginsenoside Rb₁. The SHG-44 cell showed that the G₂/M phase arrested after radiation, and the delay of G₂/M phase alleviated when adding ginsenoside Rb₁. The expressions of *MMP-2* and *MMP-9* in SHG-44 cell increased along with the increasing of X-ray dose. When ginsenoside Rb₁ was added to the cell culture, the expressions of *MMP-2* and *MMP-9* were inhibited, which decreased along with increasing of the dose of ginsenoside Rb₁. [Conclusion] Ginsenoside Rb₁ and high energy X-ray radiation show synergistic inhibition of cell proliferation. After radiation, the ability of tumor invasion and metastasis increases, while ginsenoside Rb₁ can decrease the ability of invasion and metastasis by the down-regulation of *MMPs* mRNA expression.

Subject words: high energy X-ray; ginsenoside Rb₁; glioma; *MMPs*

脑肿瘤是神经系统常见的恶性肿瘤之一, 手术加术后放射治疗是其主要治疗手段, 但患者 5 年无病生存率仍然较低。本实验旨在探讨高能 X 线对人脑胶质瘤细胞株 SHG-44 的影响及人参皂甙 Rb₁ 的防护作用。

通讯作者: 季 斌, 科主任, 主任医师, 学士; 南通大学附属医院放疗科, 江苏省南通市西寺路 20 号(226001); Email: jbrobert@163.com.
收稿日期: 2011-11-07; **修回日期:** 2012-01-13

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 细胞来源和照射源

人胶质细胞瘤 SHG-44 细胞株引自西安舟鼎国生物技术有限公司; 直线加速器射线源来源于南通大学附属医院直线加速器辐照中心西门子公司

MEVATRONKD-II型。

1.1.2 药物

人参皂甙 Rb_1 (G- Rb_1 , 吉林大学基础医学院有机化学教研室惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

将细胞分成7组,对照组:不给药,不照射;照射组1:剂量5Gy;照射组2:剂量10Gy;照射组3:剂量15Gy;加药组1: Rb_1 浓度50 μ g/ml,15Gy辐照;加药组2: Rb_1 浓度100 μ g/ml,15Gy辐照;加药组3: Rb_1 浓度200 μ g/ml,15Gy辐照。实验重复3次。

1.2.2 MTT法测定细胞周期增殖情况

将浓度为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/ml的细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,100 μ l/孔,待细胞贴壁后弃去上清,生长至对数生长期时,即辐射前12h在培养基中加不同浓度的 Rb_1 ,使 Rb_1 的终浓度分别为50 μ g/ml、100 μ g/ml、200 μ g/ml。加药后每孔用无血清DMEM培养液补充至终体积为200 μ l。

辐射后继续培养12h后加MTT溶液(5mg/ml)20 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育4h,弃上清,加入200 μ l/孔DMSO振荡溶解10min,使结晶完全溶解,在酶标仪上检测OD₄₉₀值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期

细胞被辐射后继续培养12h,用0.25%的胰酶及0.02%EDTA消化,1000r/min离心5min。PBS洗两遍,用预冷70%乙醇在-20 $^{\circ}$ C固定过夜,再用PBS洗两遍弃上清;细胞沉淀加入碘化丙啶(PI)染色液1ml混匀,4 $^{\circ}$ C避光孵育30min;用200目尼龙过滤细胞到流式细胞管中,以除去细胞团块;FACScan流式细胞仪检测,CellQuest软件计数细胞,Macquit软件分析所获得的数据。

1.2.4 RT-PCR方法检测MMP-2、MMP-9 mRNA表达

用Trizol法提取胶质瘤细胞总RNA,在M-MuLV反转录酶作用下逆转录成cDNA。以cDNA为模板,在Taq DNA聚合酶催化下进行PCR检测。MMP-2、MMP-9和内参对照GAPDH引物由上海生工生物技术有限公司合成。MMP-2:正义链:5'-GCG-GATCCAGCGCCCAGAGA-

GACAC-3';反义链:5'-TTAAGCTTCCACTC-CGGGCAGGATT-3',扩增片段长度691bp。MMP-9:正义链:5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3';反义链:5'-GCCACTTGTCTGGCGGATAAGG-3',扩增片段长度590bp。GAPDH:正义链:5'-CGGAGTCAACG-GATTGGTCTGAT-3';反义链:5'-AGCCTTCTC-CATGGTGGTGAAGAC-3',扩增片段长度306bp。PCR扩增条件为:变性94 $^{\circ}$ C,3min;退火54 $^{\circ}$ C,30s;延伸72 $^{\circ}$ C,50s。32个循环后,72 $^{\circ}$ C,10min。取5.0 μ l PCR产物在1%琼脂糖凝胶(含0.5mg/L溴化乙锭)电泳。紫外灯下观察结果,采用凝胶图像分析系统测定扩增带下的光密度值(D)。计算MMPs和GAPDH条带光密度值的比值(D/D₀)。

1.3 统计学方法

本研究数据为计量资料,统计描述以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间数据比较采用方差分析,数据用SPSS13.0统计软件包处理、分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

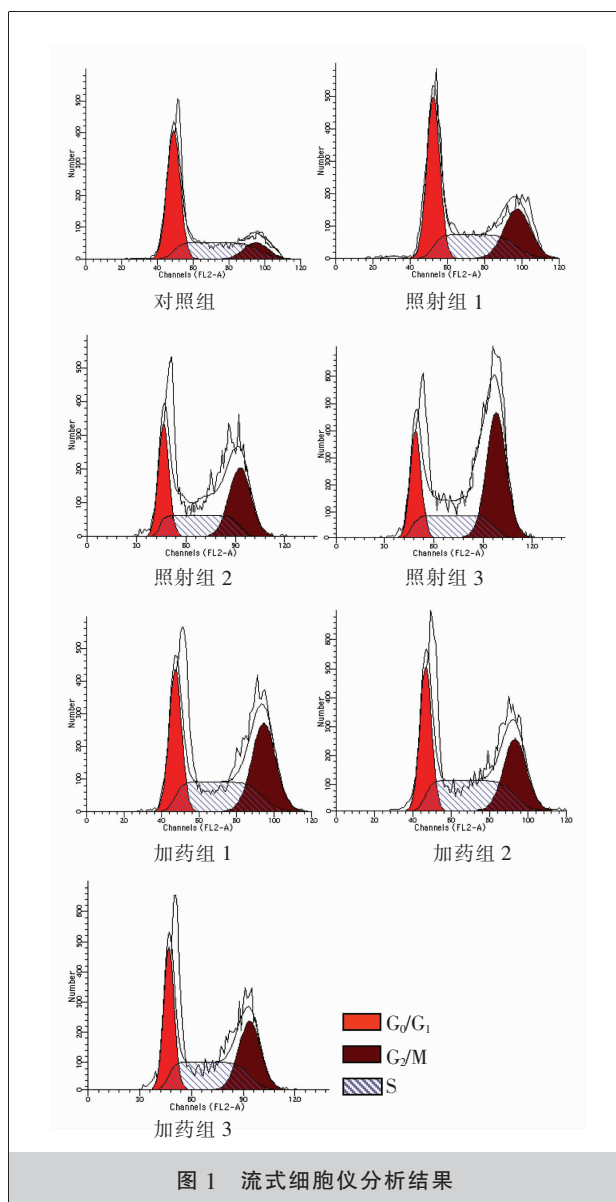
2.1 高能X线及人参皂甙 Rb_1 对SHG-44细胞增殖的影响

高能X线照射12h后,细胞增殖受到明显抑制。各照射组方差分析显示, $F=25.85, P < 0.01$,说明各照射组之间存在差异;且随照射剂量的增加,抑癌作用增强($r=-0.88, P < 0.01$)。相同照射剂量组方差分析显示, $F=51.40, P < 0.01$,说明照射组3与各加药组之间的差异亦有统计学意义。且抑癌作用随药物浓度增大而增强($r=-0.75, P < 0.05$)。人参皂甙 Rb_1 与高能X线辐射协同抑制SHG-44的增殖。见表1。

表1 高能X线及人参皂甙 Rb_1 对SHG-44细胞增殖和细胞周期率的影响

组别	照射剂量 (Gy)	人参皂甙 Rb_1 (μ g/ml)	OD值	细胞周期率(%)		
				G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
对照组	0	0	0.895 $\pm$ 0.034	68.84 $\pm$ 1.47	22.88 $\pm$ 2.60	8.25 $\pm$ 1.09
照射组1	5	0	0.798 $\pm$ 0.036*	59.05 $\pm$ 1.22	19.44 $\pm$ 2.78	21.51 $\pm$ 1.57
照射组2	10	0	0.755 $\pm$ 0.043*	30.52 $\pm$ 1.06	27.03 $\pm$ 3.29	42.47 $\pm$ 2.27
照射组3	15	0	0.645 $\pm$ 0.027*	24.89 $\pm$ 5.08	25.65 $\pm$ 1.08	49.45 $\pm$ 3.29
加药组1	15	50	0.503 $\pm$ 0.036▲	32.33 $\pm$ 1.66	24.01 $\pm$ 1.12	43.67 $\pm$ 0.55
加药组2	15	100	0.424 $\pm$ 0.018▲	36.20 $\pm$ 1.60	21.32 $\pm$ 0.67	42.48 $\pm$ 0.73
加药组3	15	200	0.409 $\pm$ 0.021▲	35.61 $\pm$ 0.69	25.08 $\pm$ 2.74	39.31 $\pm$ 2.05

注:★:与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$);▲:与照射组3相比有统计学差异($P < 0.01$)。



2.2 高能 X 线及人参皂甙Rb₁ 对 SHG-44 细胞周期的影响

高能 X 线照射 12h 后, 细胞周期阻滞于 G₂/M 期。各照射组之间是有差别的, 且随照射剂量增加 G₂/M 期细胞阻滞现象增强 ($r=0.95, P<0.01$); G₁ 期细胞减少。当加入人参皂甙 Rb₁ 后, G₂/M 期细胞受阻现象得到一定的缓和, 且随药物浓度的增加 G₂/M 期细胞减少 ($r=-0.86, P<0.01$)。G₁ 期细胞所占比例有所回升。见表 1、图 1。

2.3 高能 X 线及人参皂甙 Rb₁ 对 SHG-44 细胞 MMP-2、MMP-9 表达的影响

采用捷达 801 专业凝胶成像与分析系统定量检

测 mRNA 含量显示: MMP-2 各组平均光密度比值分别为 1.227 ± 0.045 、 1.726 ± 0.031 、 2.539 ± 0.038 、 2.969 ± 0.041 、 2.849 ± 0.025 、 2.329 ± 0.057 、 1.982 ± 0.093 ; MMP-9 各组平均光密度比值分别为 0.940 ± 0.038 、 1.112 ± 0.048 、 1.664 ± 0.095 、 2.269 ± 0.053 、 2.108 ± 0.031 、 1.375 ± 0.023 、 1.155 ± 0.048 。各照射组与对照组相比具有显著统计学差异 ($P<0.01$), 各加药组与照射组 3 相比也具有统计学差异 ($P<0.05$)。见图 2、3。随着照射剂量的增加, MMP-2、MMP-9 的表达越来越高 ($r_1=0.98, P<0.01$; $r_2=0.99, P<0.01$)。当加入人参皂甙 Rb₁ 后, 其在胶质细胞瘤 (15Gy 照射) 中的表达有所下降, 呈剂量依赖性 ($r_1=-0.94, P<0.01$; $r_2=-0.88, P<0.01$)。表明射线能增强 MMP-2、MMP-9 的表达而人参皂甙 Rb₁ 能抑制其表达。

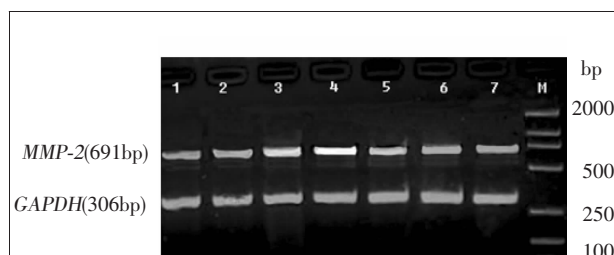


图 2 SHG-44 细胞 MMP-2 的 RT-PCR 电泳结果

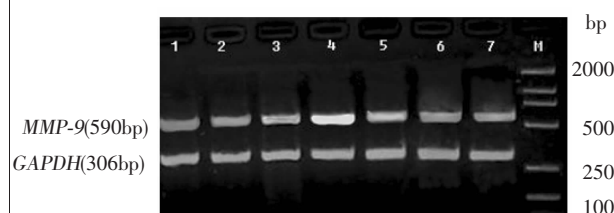


图 3 SHG-44 细胞 MMP-9 的 RT-PCR 电泳结果

3 讨论

人参皂甙 Rb₁ 属于人参二醇组皂甙, 是由人参中提取的天然活性成分, 具有抗氧化、清除氧自由基、免疫调节、神经系统保护等多种生物效应^[2-4]。本课题组已研究证实人参皂甙 Rb₁ 能预防大鼠的放射脑损伤^[5]。葛迎春等^[6]研究人参皂甙单体对宫颈癌 (HeLa) 的影响中发现人参皂甙 Rb₁ 可抑制肿瘤细

细胞的增殖及代谢活性。在本实验中,高能 X 线照射后 SHG-44 细胞增殖受到抑制,当加入人参皂甙 Rb₁ 后,细胞增殖抑制更加明显,人参皂甙 Rb₁ 和高能 X 线协同抑制肿瘤细胞增殖。

电离辐射可以改变细胞周期的进程^[7],而且辐射敏感性不同的细胞,辐射后细胞周期的变化也不同^[8]。细胞周期阻滞是辐射引起的重要生物学改变。本研究发现 SHG-44 细胞受到高能 X 线照射,在 12h 后主要发生 G₂/M 期阻滞,且随照射剂量的增大,G₂/M 期受阻现象越明显,而 G₁ 期细胞所占比例明显下降,这符合多数哺乳动物肿瘤细胞照射后反应的普遍规律^[9]。细胞阻滞于 G₂/M 期,而无明显 G₁ 期阻滞,提示该细胞可能存在野生型 p53 的缺失^[10]。G₂/M 期限制点激活,阻滞了细胞周期的进展,抑制了肿瘤细胞的增殖。这与 Danielsson 等^[11]研究结果相符。当加入人参皂甙 Rb₁ 后,G₂/M 期受阻现象得到一定的缓和,且呈浓度依赖性;G₁ 期所占比例有所回升,细胞增殖受到抑制。

放疗对于脑肿瘤来说仍是主要的辅助治疗方法之一,在临床治疗时可观察到采取手术及术后放疗综合治疗后仍复发。电离辐射能刺激 MMPs 的合成^[12-13],从而增强恶性细胞潜在的迁徙和侵袭能力。Badiga 等^[14]证实辐射能引起人神经胶质瘤细胞中 MMP-2 活性增加,加强细胞侵袭能力,通过加 MMP-2 抑制剂可阻止由辐射诱导的细胞浸润转移能力。Cheng 等^[15]在研究辐射增强原发性肝癌细胞侵袭性的机制时发现,辐射可使 MMP-9 在蛋白及 mRNA 水平表达增加,且使其活性增强,可能是通过 PI3K/Akt/NF- κ B 信号转导途径实现的。在本研究中,我们检测了人脑胶质细胞瘤细胞 SHG-44 经高能 X 线照射后 MMP-2、MMP-9 mRNA 表达的变化。结果显示经 5Gy、10Gy 和 15Gy 照射后,从 mRNA 基因水平来看,MMP-2、MMP-9 表达均有所上升,且 MMP-2 的表达要高于 MMP-9。当加入人参皂甙 Rb₁ 后 MMP-2、MMP-9 的表达均下降。

人参皂甙 Rb₁ 具有清除自由基的作用,理论上似乎应该对射线对肿瘤细胞的电离辐射同样具有保护作用,但本实验研究发现人参皂甙 Rb₁ 对射线抑制肿瘤细胞增殖的过程并没有保护作用,反而与射线协同抑制肿瘤细胞的增殖。可能是因为人参皂甙 Rb₁ 抑制肿瘤的作用大于其清除自由基的作用,具

体机制有待进一步研究。此外,本研究还发现人参皂甙 Rb₁ 可通过下调 MMP-2、MMP-9 的表达而抑制由电离辐射引起的肿瘤细胞浸润和转移的能力。

综上所述,我们认为人参皂甙 Rb₁ 对胶质细胞瘤放射具有双向作用,即一方面可以预防和保护正常脑组织的放射性损伤,另一方面对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制作用,并可阻滞由电离辐射引起的肿瘤细胞迁徙和侵袭性增强的负效应的作用。这一效应一旦经临床验证,将使广大颅内胶质细胞瘤患者受益。

参考文献:

- [1] 萨姆布鲁克 J 著.黄培堂译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,2002.636-643.
- [2] 胡松华,林锋强.人参皂甙 Rb₁ 的免疫佐剂作用[J].中国兽医学报,2003,23(5):480-482.
- [3] Radad K,Gille G,Moldzio R,et al. Ginsenosides Rb₁ and Rg1 effects on survival and neurite growth of MPP(+)-affected mesencephalic dopaminergic cells [J]. J Neural Transm,2004,111(1): 37-45.
- [4] 李勇,朱晓燕,凌昌全.人参皂甙单体 Rb₁ 对急性早幼粒细胞系增殖及糖皮质激素受体 α 表达的影响[J].中国病理生理杂志,2004,20(9):1572-1575.
- [5] 赵洪瑜.人参皂甙 Rb₁ 预防大鼠放射性脑损伤的实验研究[D].南通大学,2007,T03033.
- [6] 葛迎春,刘平,韩信昌.人参皂甙 Rb₁、Rg1、Re 和 Rh1 对 HeLa 细胞的影响[J].中药药理与临床,1997,13(6):18-20.
- [7] Teyssier F,Bay JO,Dionet C,et al. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation [J]. Bull Cancer,1999,86(4): 345-347.
- [8] Hunáková L,Chorváth M,Duraj J,et al. Radiation induced apoptosis and cell cycle alteration in human carcinoma cell lines with different radiosensitivities [J]. Neoplasma,2000,47(1): 25-31.
- [9] O'Connell MJ,Walworth NC,Carr AM. The G₂ phase DNA-damage checkpoint[J]. Trends Cell Biol,2000,10(7): 296-303.
- [10] Böhne A,Westphal F,Schmidt A,et al. Role of p53 mutations,protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells[J]. Int J Radiat Biol,2004,80(1): 53-63.
- [11] Danielsson A,Karlsson E,Delle U,et al. The biological effect of pentoxifylline on the survival of human head and neck cancer cells treated with continuous low and high dose-rate irradiation [J]. J Cancer Res Clin Oncol,2005,131(7): 459-467.
- [12] Zhai GG,Malhotra R,Delaney M,et al. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via action of the Rho signaling pathway [J]. J Neurooncol,2006,76(3):227-237.
- [13] Lemay R,Archambault M,Tremblay L,et al. Irradiation of normal mouse tissue increases the invasiveness of mammary cancer cells[J]. Int J Radiat Biol,2011,87(5):472-482.
- [14] Badiga AV,Chetty C,Kesanakurti D,et al. MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells[J]. PLoS One,2011,6(6): e20614.
- [15] Cheng JC,Chou CH,Kuo ML,et al. Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF- κ B signal transduction pathway[J]. Oncogene,2006,25(53): 7009-7018.