

人参皂苷 Rg3 抑制肺癌 NCI-H1650 细胞增殖作用研究

饶远权, 刘杏娥, 王廷祥, 张 宇, 魏 楠

(浙江医院, 浙江 杭州 310013)

摘 要: [目的] 研究人参皂苷 Rg3 对肺腺癌 NCI-H1650 细胞增殖的抑制作用及对凋亡的影响。[方法] MTT 法检测人参皂苷 Rg3 对 NCI-H1650 细胞增殖的抑制作用, Annexin-V-FITC/PI 法检测细胞凋亡, Western blot 法检测 caspase-3、Bcl-2、Bax、survivin 蛋白表达的情况。[结果] 不同浓度人参皂苷 Rg3 能有效抑制 NCI-H1650 细胞增殖, 且呈时间剂量依赖性 ($P < 0.01$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷作用 NCI-H1650 细胞 24、48h, 细胞凋亡率明显增加, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷作用 NCI-H1650 细胞 48h, Bcl-2、survivin 蛋白表达降低, caspase-3、Bax 蛋白表达增加, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。[结论] 人参皂苷 Rg3 对肺腺癌 NCI-H1650 细胞增殖具有明显的抑制作用, 呈时间剂量依赖关系, 其机制可能与降低细胞 Bcl-2、survivin 蛋白表达, 增加 caspase-3、Bax 蛋白表达, 促进细胞凋亡有关。

关键词: 人参皂苷; 肺肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)06-0413-04

Ginsenoside Rg3 Inhibiting Proliferation of Lung Cancer NCI-H1650 Cells

RAO Yuan-quan, LIU Xing-e, WANG Ting-xiang, et al.

(Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

Abstract: [Purpose] To investigate ginsenoside Rg3 inhibiting proliferation of lung cancer NCI-H1650 cells and its influence on cell apoptosis. [Methods] Inhibitive effect of ginsenoside Rg3 on proliferation of lung cancer NCI-H1650 cells was detected by MTT assay, and cell apoptosis was detected by Annexin-V-FITC/PI assay, expressions of caspase-3, Bcl-2, Bax, survivin proteins were detected by Western blot. [Results] Ginsenoside Rg3 with various concentrations effectively inhibited the proliferation of NCI-H1650 cells with a time-dose dependent manner ($P < 0.01$). Compared with the control group, ginsenoside Rg3 in a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ significantly increased the apoptosis rate of NCI-H1650 cells in 24h and 48h ($P < 0.01$). Compared with the control group, expressions of Bcl-2 and survivin decreased after NCI-H1650 cells treated with ginsenoside Rg3 in a concentration of 20 $\mu\text{mol/L}$ for 48h, with significant difference between the two groups ($P < 0.01$). [Conclusion] Ginsenoside Rg3 could significantly inhibit the proliferation of NCI-H1650 cells with time-dose dependent manner, and the mechanism may be related to reduce Bcl-2, survivin proteins' expressions, increase caspase-3, Bax proteins' expressions, promote cell apoptosis.

Subject words: ginsenoside; lung neoplasms; cell apoptosis

人参是我国传统的中药, 其有效成分为人参皂苷, 现已分离出 40 多种, 其中一种四环三萜类成分人参皂苷 Rg3 具有显著的抗肿瘤作用。本研究旨在通过人参皂苷 Rg3 作用肺腺癌 NCI-H1650 细胞, 来探讨人参皂苷 Rg3 对肺癌细胞的抑制作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人肺腺癌细胞株 NCI-H1650 购自中科院上海细胞所。人参皂苷 Rg3 购自浙江美迪康医药有限公司, 编号 110804, 分子式: $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$, 分子量: 785.01, 溶于 DMSO 配成 100mg/ml 储存浓度, 用培养液稀释

基金项目: 浙江省中医药科技计划基金资助项目 (2013ZA014)

收稿日期: 2013-03-19; **修回日期:** 2013-05-14

至所需浓度, DMSO 在各组培养液中的终浓度均为 1ml/L。MTT 和胰酶购自美国 Sigma 公司。RPMI 1640 培养基购自美国 GIBCO 公司。胎牛血清购自杭州四季青公司。Annexin V-FITC & PI Apoptosis Detection Kits 试剂购自美国 Becton Dickinson 公司。抗 caspase-3、抗 Bax、抗 Bcl-2、抗 survivin 抗体购自美国 Cell signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养细胞, 每 2~3d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测人参皂苷 Rg3 对细胞的抑制率

NCI-H1650 细胞常规胰酶消化接种于 96 孔板, 每孔 4 000 个细胞/100μl, 培养 24h 贴壁, 倒去培养液, 分别加入含不同浓度的人参皂苷 Rg3 培养液 100μl, 浓度为 1、5、10、20、40、80、160μmol/L, 另设对照孔(只加培养液 100μl), 每组设 8 个复孔。细胞培养 24、48 和 72h 后, 每孔加入 5mg/ml MTT 液 15μl, 继续培养 4h, 吸去上液, 每孔加入 DMSO 150μl, 轻轻振荡后用酶标仪检测 550nm 处各孔吸光值 OD₅₅₀, 计算抑制率, 细胞抑制率=(1-实验组 OD₅₅₀/对照组 OD₅₅₀)×100%。

1.2.3 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

NCI-H1650 细胞按每瓶 10×10⁴ 接种, 设对照组及 20μmol/L 人参皂苷 Rg3 组, 作用 24、48h, 每组 3 个样本。收集细胞, 加入 5μl FITC Annexin V 和 5μl PI, 轻微振荡, 室温下(25℃)避光孵育 15min, 加入 400μl 1×Binding Buffer, 流式细胞仪检测。

1.2.4 Western blot 检测 caspase-3、Bax、Bcl-2、survivin 蛋白表达

20μmol/L 人参皂苷 Rg3 处理细胞 48h, PBS 缓冲液洗涤细胞, 1×SDS 上样缓冲液裂解细胞, 95℃~100℃加热 10min 5 000r/min 离心 10min, 取上清, SDS-PAGE 胶(8%

积层胶、12%分离胶) 80~100V 电泳后, 蛋白 100V 恒压电转移至 PVDF 膜, 含 5%脱脂奶粉的 TBST 浸润 PVDF 膜 1h 封闭非特异性结合, 加入一抗 4℃过夜, 加入二抗室温孵育 1h, PVDF 膜加入发光底物, X-ray 曝光显示目的蛋白条带。GAPDH 蛋白作为内参照以显示相同的上样量。

1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行配对资料方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H1650 细胞增殖的抑制作用

不同浓度的人参皂苷 Rg3 以及不同用药时间对 NCI-H1650 细胞有着不同程度的体外抑制作用, 呈现时间—剂量依赖性, 行两因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{concentration}}=665.76, P<0.01; F_{\text{treatment time}}=103.71, P<0.01$)(Table 1, Figure 1)。

Table 1 Inhibition rate of NCI-H1650 cells by ginsenoside Rg3 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Ginsenoside Rg3 (μmol/L)	Cell inhibition rate(%)		
	24h	48h	72h
0	0	0	0
1	5.53±0.87	6.97±1.01	10.90±1.49
5	11.10±1.47	16.67±1.83	22.13±1.16
10	22.17±1.79	29.77±1.89	34.77±1.90
20	36.87±1.91	48.57±1.75	55.73±1.85
40	47.47±2.15	61.60±1.91	69.73±2.41
80	60.50±2.21	73.63±1.83	81.17±2.76
160	75.93±2.48	81.37±2.99	85.97±3.73

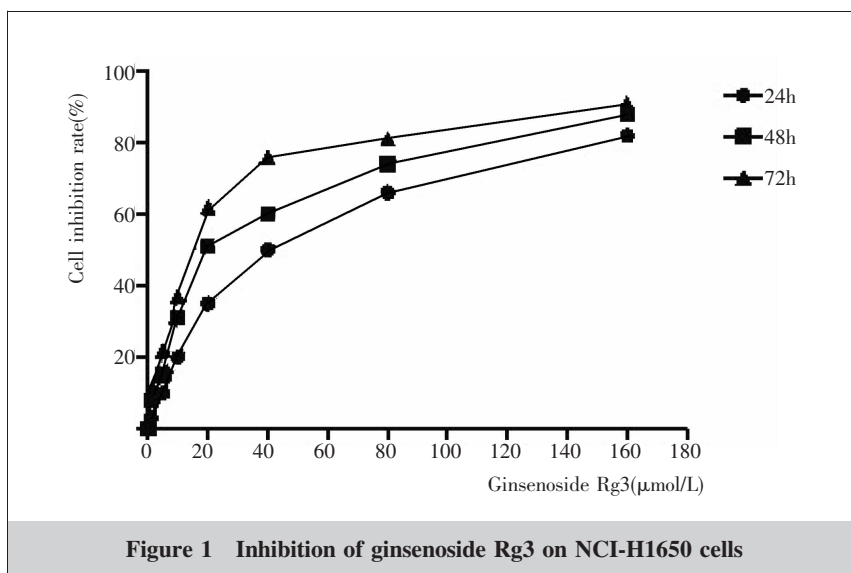


Figure 1 Inhibition of ginsenoside Rg3 on NCI-H1650 cells

2.2 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H1650 细胞凋亡诱导的作用

NCI-H1650 细胞经人参皂苷 Rg3 处理 24h 及 48h 后,处理组比对照组凋亡明显增加,差异有统计学意义($F_{\text{treatment}}=207.29, P<0.01; F_{\text{time}}=21.45, P<0.01$)(Table 2, Figure 2)。

2.3 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H1650 细胞 caspase-3、Bax、Bcl-2、survivin 蛋白表达的影响

NCI-H1650 细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg3 处理 48h 后,Bcl-2、survivin 蛋白表达降低,caspase-3、Bax 蛋白表达增加(Figure 3)。行 t 检验,处理组与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

肺癌居我国及世界恶性肿瘤死因之首位,目前治疗效果不理想。传统的化疗药物疗效已经进入平台期,而小分子酪氨酸激酶抑制剂亦常出现耐药。从植物中寻找结构新颖和作用独特的抗肿瘤活性成分或先导化合物是抗肿瘤药物研究的一条重要途径。目前上市的抗肿瘤药物中,大部分为天然药物或者是以天然产物为先导的合成和半合成衍生物。大量的研究证明,皂苷类成分具有较好的抗肿瘤作用,且作用靶点和途径比较广泛。皂苷在抑制肿瘤细胞生长、阻滞肿瘤细胞有丝分裂、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞转移以及逆转多药耐药等多个方面具有良好的活性^[1-7]。

人参皂苷 Rg3 能在分子水平上通过不同途径诱导细胞凋亡,凋亡细胞在被诱导产生特征性 DNA 降解和形态学改变之前,有一个不可逆的线粒体膜结构和功能改变,包括线粒体皱缩、内膜跨膜电位消失、通透性转换孔打开和线粒体内活性蛋白酶产物释放等,作用机制较为广泛。有文献报道人参皂苷 Rg3 能够抑制人肝癌细胞 Hep1-6 和 HepG2 的增殖,通过诱导细胞固有凋亡途径,能改变 Bcl-2 家族蛋白和 caspase-3 的活性,从而促进细胞凋亡^[2]。人参皂苷 Rg3 还可以通过抑制 Pim-3 的表达,促进 pBad(Ser112)表达诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞凋亡,抑制其增殖^[3]。通过调节 HT-29 结肠癌细胞中的腺苷酸蛋白活化激酶(AMPK)的信号通路诱导细胞凋亡,20(S)-Rg3 能够下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的

Table 2 Apoptotic rate of NCI-H1650 cells after treatment ($\bar{x}\pm s, \%$)

Groups	24h	48h
Control	2.36 $\pm$ 0.47	4.77 $\pm$ 0.22
Treatment	18.15 $\pm$ 2.58	26.81 $\pm$ 3.43

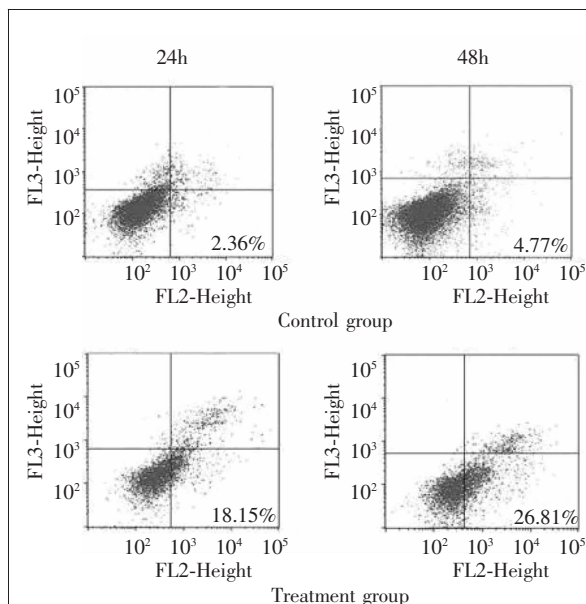


Figure 2 Apoptosis of NCI-H1650 cells

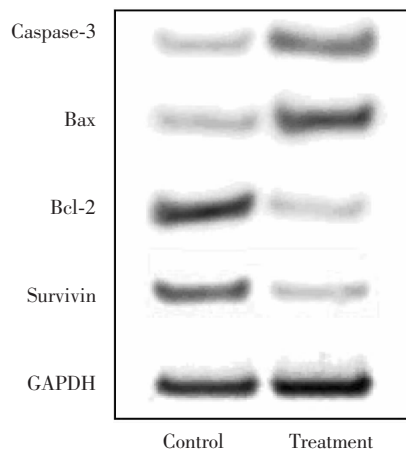


Figure 3 Western blot assay results

表达,上调促凋亡蛋白 p53 和 Bax 蛋白的表达,引起线粒体中的细胞色素 C、DNA 修复酶 (PARP) 和 caspase-3 的活化,通过介导 AMPK 信号通路诱导结肠癌的细胞凋亡^[4]。人参皂苷 Rg3 能通过促进肺癌细胞 NCI-H460 细胞内 Bax 蛋白的表达并增加 Bax/Bcl-2 比值,降低线粒体跨膜电位,提高细胞内游离

钙离子浓度,最终经线粒体通路诱导细胞凋亡^[5]。人参皂苷还能够降低肺癌 A549 细胞 survivin 蛋白的表达,显著增加顺铂对肺癌 A549 细胞的致凋亡作用^[6]。人参皂苷 Rg3 还对小鼠肺腺癌多药耐药 (MDR) 有逆转作用,其作用机制可能是下调 *MDR1* mRNA、*MRP1* mRNA 及其蛋白的表达^[7]。

Caspase 家族在细胞死亡信号传导过程中起核心作用,caspase-3 是 caspase 家族中最重要的细胞凋亡执行者之一,在蛋白酶级联切割过程中它处于核心位置,发挥着非常重要的作用,一旦 caspase 被激活就会导致细胞死亡,因此被称为死亡蛋白酶。它可以通过死亡受体介导途径与线粒体依赖途径来诱发细胞凋亡。*Bax* 基因与 *Bcl-2* 基因有 21% 的同源性,*Bax* 可与 *Bcl-2* 形成同源或异源二聚体,具有抑制 *Bcl-2*,促进细胞凋亡的作用。细胞内 *Bax* 和 *Bcl-2* 的量决定了 *Bcl-2/Bax* 和 *Bax/Bax* 二聚体的比例,而这一比例又决定了细胞对凋亡信号的易感性,调节细胞死亡和存活的平衡状态。*Survivin* 基因是近年来发现的凋亡抑制基因,属凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAP),*survivin* 基因在胚胎组织中表达,在正常成熟组织中几乎不表达,而在转化细胞和各种人类肿瘤细胞中高表达。*Survivin* 基因可以抑制由 *BAX*、*Trail* 等凋亡诱导因子所诱导的细胞凋亡。*Survivin* 主要通过抑制 caspase 家族成员的 caspase-3 和 caspase-7 的活性而发挥抗凋亡作用^[8]。

本研究显示不同浓度人参皂苷 Rg3 能有效抑制肺腺癌 NCI-H1650 细胞增殖,且具有时间剂量依赖性。人参皂苷 Rg3 能诱导 NCI-H1650 细胞明显凋亡,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。并诱导 *Bcl-2* 及 survivin 蛋白表达降低、*Bax* 及 caspase-3 蛋白表达增加,处理组与对照组相比,具有统计学意义($P < 0.01$)。表明人参皂苷 Rg3 对肺腺癌 NCI-H1650 细胞增殖具有明显的抑制作用,机制可能与调节 *Bax*、*Bcl-2*、caspase-3 以及 survivin 蛋白表达以促进细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] Zhao PJ, Feng JG, Ma SL. In vitro study of radiosensitization of saponin I on lung adenocarcinoma A549 cell line [J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(2): 108-110. [赵鹏军, 冯建国, 马胜林. 重楼皂苷 I 对肺腺癌 A549 细胞系放射增敏作用研究[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(2): 108-110.]
- [2] Jiang JW, Chen XM, Chen XH, et al. Ginsenoside Rg3 inhibit hepatocellular carcinoma growth via intrinsic apoptotic pathway [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17 (31): 3605-3613.
- [3] Jian J, Liu LZ, Li XY et al. Effects of ginsenoside Rg3 on the expression of Pim-3 and Bad in human hepatocarcinoma cell lines [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2008, 16(20): 2229-2233. [简捷, 刘利珍, 李小燕, 等. 人参皂苷 Rg3 对人肝癌细胞 Pim-3 及 Bad 凋亡蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(20): 2229-2233.]
- [4] Yuan HD, Quan HY, Zhang Y, et al. 20 (S)-ginsenoside Rg3-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells is associated with AMPK signaling pathway [J]. Mol Med Report, 2010, 3(5): 825-831.
- [5] Wang GL, Cui JS, Wang XR, et al. Mechanism of apoptosis of lung carcinoma cell line NCI-H460 induced by 20(S)-ginsenoside Rg3 [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2008, 34(6): 980-984. [王光兰, 崔俊生, 王心蕊, 等. 20 (S)-人参皂苷 Rg3 诱导肺癌细胞 NCI-H460 凋亡的机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2008, 34(6): 980-984.]
- [6] Ye LX, Long N, Huang HQ, et al. Mechanism of ginseng saponin increasing anti-lung cancer A549 cell activity of cisplatin [J]. Shandong Medical Journal, 2012, 52 (12): 77-78. [叶立新, 龙娜, 黄慧青, 等. 人参皂苷增加顺铂抗肺癌 A549 细胞活性的机理研究[J]. 山东医药, 2012, 52(12): 77-78.]
- [7] He JB, Liao HZ, Zhang YQ. Multidrug resistance reversal effect of ginsenoside Rg3 lung adenocarcinoma in mice [J]. Journal of Practical Oncology, 2012, 27 (4): 373-377. [贺兼斌, 廖慧中, 张贻秋, 等. 人参皂苷 Rg3 对小鼠肺腺癌多药耐药的逆转作用[J]. 实用肿瘤杂志, 2012, 27(4): 373-377.]
- [8] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.