

• 基础实验研究论著 •

20(S)-人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 Hela 细胞增殖及凋亡的作用*

李向东¹, 田新梅¹, 刘 楼², 张 婷², 臧 嘉², 陈 瑜^{1,2}, 陈万瑛¹, 于爱萍¹, 陈道桢^{1,2△}

(1. 阿合奇县人民医院外科, 新疆克孜勒苏柯尔克孜自治州 843500;

2. 南京医科大学附属无锡妇幼保健院中心实验室, 江苏无锡 214002)

摘要:目的 观察 20(S)-人参皂苷 Rg3(SPG-Rg3) 对人宫颈癌 Hela 细胞增殖及凋亡的作用及其可能作用机制。方法 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察 SPG-Rg3 对 Hela 细胞的杀伤作用, 并计算其半抑制浓度(IC₅₀)。采用流式细胞术检测 SPG-Rg3 作用后 Hela 细胞的细胞周期及细胞凋亡情况。结果 SPG-Rg3 浓度为 20~400 μg/mL 时, SPG-Rg3 对细胞增殖的抑制率随其浓度的增高而增大, 作用强度呈浓度依赖性, 二者呈正相关($r=0.922\ 5$, $P<0.05$)。SPG-Rg3 对 Hela 细胞的 IC₅₀ 为 85.1 μg/mL。经 SPG-Rg3 作用 48 h 后, SPG-Rg3 实验组 Hela 细胞处于 S 期的细胞数与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$); SPG-Rg3 实验组处于 G₂/M 期的细胞数明显少于对照组($P<0.01$)。SPG-Rg3 实验组 Hela 细胞于 G₁ 期峰前出现显著的凋亡峰, 且凋亡细胞数与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 SPG-Rg3 能杀伤体外生长的 Hela 细胞, 并诱导其凋亡。

关键词: 宫颈肿瘤; 细胞凋亡; 增殖; 人参皂苷; Hela 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2801-02

Effects of 20(S)-ginsenoside Rg3 on proliferation and apoptosis of human cervical neoplasm Hela cells*

Li Xiangdong¹, Tian Xinmei¹, Liu Lou², Zhang Ting², Zang Jia²,

Chen Yu^{1,2}, Chen Wanying¹, Yu Aiping¹, Chen Daozhen^{1,2△}

(1. Department of Surgery, People's Hospital of Aheqi County, Kirgiz Autonomous Prefecture, Xinjiang

843500, China; 2. Central Laboratory, Wuxi Maternal & Child Health Hospital

Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214002, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of 20(S)-ginsenoside Rg3(SPG-Rg3) on proliferation and apoptosis of human cervical neoplasm Hela cells and its possible mechanism. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method was adopted to observe the lethal effect of SPG-Rg3 on Hela cells and calculated its half maximal inhibitory concentration(IC₅₀). Flow cytometry was employed to measure the cell cycle and apoptosis of Hela cells after SPG-Rg3 treatment. **Results** When SPG-Rg3 concentration were 20—400 μg/mL, the inhibitory rates of cell proliferation were raised with the increasing concentration of SPG-Rg3, and dose-dependent effects and their positive correlation($r=0.922\ 5$, $P<0.05$) were observed. The IC₅₀ of SPG-Rg3 on Hela cells was 85.1 μg/mL. Compared the SPG-Rg3 treatment group and control group after 48 h SPG-Rg3 treatment, the difference of cell population in S phase of cell cycle was statistically significant($P<0.01$), and cell population in G₂/M stage in the SPG-Rg3 treatment group was significantly lower than that in control group($P<0.01$). An obvious apoptotic peak was observed before the peak of G₁ phase of Hela cells in the SPG-Rg3 treatment group, and compared its amount of apoptotic cells with that in the control group, the difference showed statistically significant($P<0.01$). **Conclusion** SPG-Rg3 can kill the Hela cells *in vitro* and induce their apoptosis.

Key words: uterine cervical neoplasms; apoptosis; proliferation; ginsenoside; Hela cells

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一, 占女性生殖系统恶性肿瘤的半数以上, 是东亚地区常见的八大癌症之一^[1]。据 2012 年《中国肿瘤登记年报》显示, 目前中国每年新发宫颈癌病例有 10 万人, 占全球病例的 1/5, 严重威胁广大妇女的生命健康^[2]。近年研究发现, 20(S)-人参皂苷 Rg3[20(S)-ginsenoside Rg3, SPG-Rg3] 有明显的抗肿瘤作用^[3-4]。本研究观察了 SPG-Rg3 对人宫颈癌 Hela 细胞的体外杀伤作用, 并初步探讨其作用机制, 为 SPG-Rg3 在宫颈癌临床治疗方面积累一些实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养 人宫颈癌 Hela 细胞株购于武汉大学

中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。将其用 RPMI 1640 培养基培养, 各培养基中均常规加入 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)及链霉素(100 mg/mL)。

1.2 主要试剂 SPG-Rg3 购自上海纯优生物科技有限公司(纯度: ≥97%); 胎牛血清和 RPMI 1640 培养基为美国 Gibco BRL 公司产品; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为美国 Sigma 公司产品; 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)及碘化丙啶(propidium iodide, PI)为荷兰 Pharming 公司产品, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)将其溶解, 其溶液浓度分别为 5 g/L 和 65 g/L, 避光储存

* 基金项目: 新疆克州科技资助项目(2013-13-27); 江苏省中医药局科技资助项目(LB11048); 江苏省“科教兴卫工程”专项经费资助项目(RC2011033)。 作者简介: 李向东(1969~), 男, 副主任医师, 主要从事肿瘤外科的研究或工作。 △ 通讯作者, E-mail: chendaozhen@163.com。

于 4℃;其余试剂均为市售分析纯。

1.3 主要仪器 主要仪器为 BS-110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)、MM1 微型振荡器(上海精密生化仪器厂)、CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司)、美国 Bio-rad 550 酶标仪、FACS-Calibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.4 SPG-Rg3 的配制 将 SPG-Rg3 粉末用 DMSO 溶解,用 RPMI 1640 培养基稀释成实验所需的浓度,DMSO 终浓度小于 0.01%。

1.5 MTT 检测 将 HeLa 细胞接种于 96 孔细胞培养板(1.5×10⁴ 个/孔),置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养;24 h 后,待细胞贴壁生长良好时,各孔加入 SPG-Rg3 溶液,使其终浓度分别为 0、20、40、80、160、320、400 μg/mL,每个浓度级设 4 个复孔,于 37℃、5% CO₂ 培养箱内静置培养;48 h 后,每孔加入 MTT 溶液 50 μL(1 mg/mL),继续培养 4 h;加入 DMSO(150 μL/孔)溶解沉淀,用微型振荡仪振荡 10 min,混匀;酶标仪测定 490 nm 波长处的光密度(optical density,OD)值,取 3 孔平均 OD 值。以不加任何细胞的一孔为空白调零,以不加 SPG-Rg3 的 HeLa 细胞为对照,计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。以细胞生长抑制率和药物浓度进行回归分析,计算药物半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC₅₀)值。

1.6 流式细胞术检测 将处于对数生长期的 HeLa 细胞采用胰酶消化,调整细胞密度,将其接种于 6 孔细胞板,使孔内细胞密度为 5×10³ 个/孔,待细胞生长至 75%融合状态时,将细胞按处理方式分为阴性对照组(仅加入 DMSO)及 SPG-Rg3 实验组(加入 SPG-Rg3,终浓度为 80 μg/mL)。阴性对照组及 SPG-Rg3 实验组 HeLa 细胞分别继续培养 48 h 后,收集 HeLa 细胞,用 PBS 溶液洗涤 1 次,用预冷的乙醇固定,-20℃过夜。固定后细胞用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度为 1×10⁶/mL。然后,加入含终浓度为 0.25 mg/mL 的核糖核酸酶 A(ribonuclease, RNase A)及 PI 染色液(终浓度为 50 μg/mL),室温下避光进行 DNA 染色 30 min。最后,采用流式细胞仪检测 DNA 含量,计算各期细胞所占比例,数据采用 WinMDI 软件进行统计分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞生长抑制率与药物浓度的关系采用直线回归与 Pearson 相关分析,多个样本均数间的两两比较采用方差分析 *q* 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的杀伤作用 SPG-Rg3 浓度为 20 μg/mL 时,HeLa 细胞的生长受到轻度抑制;SPG-Rg3 浓度为 160 μg/mL 时,HeLa 细胞的生长受到明显抑制(抑制率为 79.2%)。SPG-Rg3 浓度为 20~400 μg/mL 时,SPG-Rg3 对细胞增殖的抑制率随其浓度的增高而增大,作用强度呈浓度依赖性,二者呈正相关($r=0.922\ 5, P<0.05$)。SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的 IC₅₀ 为 85.1 μg/mL,见图 1。

2.2 SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的细胞周期和凋亡的影响 经 SPG-Rg3 作用 48 h 后,SPG-Rg3 实验组 HeLa 细胞处于 S 期的细胞数与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);而处于 G₂/M 期的细胞数明显少于对照组($P<0.01$),见表 1。SPG-Rg3 实验组 HeLa 细胞于 G₁ 期峰前出现显著的凋亡峰,且凋亡细胞数与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),这表明 SPG-Rg3 能够抑制宫颈癌 HeLa 细胞 DNA 合成,将其阻滞

于 S 期,使进入分裂期的细胞数量减少,促进细胞凋亡。

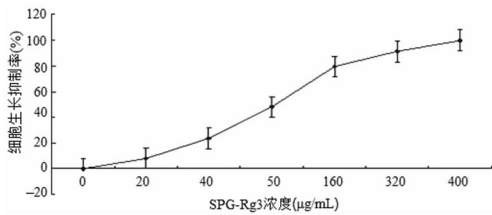


图 1 不同浓度 SPG-Rg3 作用于 HeLa 细胞后的生长曲线

表 1 SPG-Rg3 对 HeLa 细胞细胞周期及其凋亡率的影响(%)

组别	G ₀ ~G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	细胞凋亡率
对照组	71.23±4.53	0.47±0.63	28.31±3.26	0.57±0.68
SPG-Rg3 实验组	48.61±5.13	50.36±3.21*	1.03±0.46*	31.75±3.21*

*: $P<0.01$,与对照组比较。

3 讨 论

人参皂苷是人参的主要有效成分,现已明确的人参皂苷单体约有 40 余种^[5],在人参中的含量为 4%左右^[6],其中,研究最多且与肿瘤细胞凋亡密切相关的为人参皂苷 Rg3^[7]。人参皂苷 Rg3 属原人参二醇型皂苷,存在 2 种同型异构体,分别为 SPG-Rg3 和 RPG-Rg3。目前 RPG-Rg3 已被应用于临床抗肿瘤治疗^[8]。与 RPG-Rg3 相比,SPG-Rg3 水溶性好,生物利用率高且毒性小,具有更广泛的应用前景^[9]。很多研究表明,人参皂苷 Rg3 具有较高的抗肿瘤活性,能通过调控肿瘤细胞增殖周期、诱导细胞分化和凋亡来发挥抗肿瘤作用。本研究中,体外实验选取不同浓度的 SPG-Rg3 分别作用于 HeLa 细胞,结果显示 SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的生长有明显抑制作用,并且,随着 SPG-Rg3 作用浓度的增加,抑制作用明显增大,SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的作用强度呈明显的浓度依赖性^[10-12]。

研究表明,细胞周期的阻滞和细胞凋亡的诱导是一致的^[13]。肿瘤细胞的凋亡与其发生、发展及消退等存在密切的关系^[14-15]。本研究发现,HeLa 细胞经 SPG-Rg3 作用 48 h 后,SPG-Rg3 实验组中凋亡细胞数显著增加。流式细胞术检测也发现,SPG-Rg3 实验组 HeLa 细胞在 G₁ 期前出现了凋亡峰,显示凋亡细胞数增多,而该凋亡峰未出现在对照组的 HeLa 细胞,这表明 SPG-Rg3 具有诱导 HeLa 细胞凋亡的作用。由此可见,SPG-Rg3 作为一种高效抗肿瘤药物,其抑制肿瘤的作用可能与其诱导肿瘤细胞的凋亡密切相关。

本研究结果显示,SPG-Rg3 对 HeLa 细胞的生长有抑制作用。这为 SPG-Rg3 的临床应用提供了实验依据。

参考文献

[1] 杨玲,皇甫小梅,张思维,等.中国 20 世纪 70 年代与 90 年代子宫颈癌死亡率及其变化趋势[J].中国医学科学院学报,2003,25(4):386-390.

[2] 赫捷,赵平,陈万青.2011 中国肿瘤登记年报[M].北京:军事医学科学出版社,2012.

[3] 许天敏,崔满华,谷丽萍,等.20(S)-人参皂苷 Rg3 对卵巢癌生长抑制作用的实验研究[J].中国实用妇科与产科杂志,2007,23(2):108-110.

[4] 陈声武,王岩,王毅,等.人参皂苷 Rg1 和 Rh1 抗肿瘤作用的研究[J].吉林大学学报:医学版,2003,29(1):25-28.(下转第 2805 页)

常家兔血清为一抗则无阳性着色,见图 3,说明所制备的兔抗人 KiSS-1 抗体可特异性识别天然状态下的 KiSS-1 分子,抗体具有高特异性及良好的活性。

3 讨 论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中的病死率居首位,尽管目前手术、化疗和放疗技术不断改进,但 5 年生存率仍无明显提高。若能提高早期卵巢癌的诊断率,即可明显提高卵巢癌的总体治疗效果。因此,目前国内、外许多有关肿瘤标记物,免疫组织化学水平,基因水平的癌基因与抑癌基因的研究正在进行^[4]。

本实验采用手术切除的卵巢癌组织提取总 RNA,所用组织选择合理,用 RT-PCR 技术扩增出 452 bp 的 KiSS-1 编码区基因片段,序列与 GenBank 上登录序列完全一致。为便于纯化,本实验选用了含 6×His 的 pET28 载体。通过 Ni²⁺-NTA 凝胶亲和层析,获得纯化的目的蛋白,经凝胶扫描分析显示,所得的蛋白纯度为 93%,纯度较高,能用于进一步的相关研究工作。

KiSS-1 蛋白可与 Src 癌蛋白结合,从而抑制肿瘤转移。KiSS-1 基因还可与 GPR54 结合,激活 PLC,PLC 的激活引起细胞内钙离子的增加从而抑制肿瘤细胞增生,诱导肿瘤细胞分化和凋亡^[5]。国内、外研究发现, KiSS-1 的缺失是淋巴结转移的重要指标^[6-9]。目前,有多种学说可以解释 KiSS-1 抑制肿瘤转移的现象,但更多学者认为 KiSS-1 可能对基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 的表达存在着明显的负调控作用,后者可以降解细胞外基质和基底膜上的胶原、层黏连蛋白和纤维结合蛋白等主要结构。但在卵巢癌发生、发展中 KiSS-1 基因的表达机制还未阐明,因此,深入研究 KiSS-1 基因的表达与卵巢癌的侵袭、转移及预后的关系具有重要意义。

肿瘤的发生、发展是多基因、多因素的综合作用,而每种基因在肿瘤中的作用表型亦受多个因素的调控,从而表现出组织特异性。目前研究认为, KiSS-1 基因的表达缺失与 6q16-q23 区杂合性缺失(LOH)有关^[10],该项检测在临床上的研究也还未广泛展开。因此,笔者下一步的研究工作,一方面着手构建 KiSS-1 真核表达质粒,将质粒转染至卵巢癌细胞株,探讨 KiSS-1 基因在卵巢癌发生、发展和淋巴结转移中的机制;另一

方面利用已经制备的抗人 KiSS-1 抗体,为进一步建立 KiSS-1 的 ELISA 检测方法奠定了坚实的基础,为卵巢癌的免疫学诊断提供理论依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1): 10-30.
- [2] Schmid K, Wang X, Haitel A, et al. KiSS-1 overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study[J]. Virchows Arch, 2007, 450(2): 143-149.
- [3] 陈章权, 何素辉, 陆田田, 等. 兔抗人肥大细胞羧肽酶抗体的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(9): 859-861.
- [4] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [5] Young LS, Searle PF, Onion D, et al. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application[J]. J Pathol, 2006, 208(2): 299-318.
- [6] Dhar DK, Naora H, Kubota H, et al. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma[J]. Int J Cancer, 2007, 111(6): 868-872.
- [7] 王春晖, 乔宪, 戴显伟, 等. 人胰腺癌 KiSS-1 基因 mRNA 表达及其临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(3): 207-210.
- [8] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer; loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome [J]. Am J Pathol, 2003, 162(2): 609-617.
- [9] 崔国忠, 张志刚, 戴殿禄, 等. KiSS-1 MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤杂志, 2008, 35(18): 1054-1056.
- [10] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 411(6837): 613-617.

(收稿日期: 2013-07-20)

(上接第 2802 页)

- [5] 窦德强, 靳玲, 陈英杰. 人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(2): 151.
- [6] 程慧, 宋新波, 张丽娟. 人参皂苷 Rg3 与 Rh2 的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 307-311.
- [7] Yun TK, Lee YS, Lee YH, et al. Anticarcinogenic effect of Panax ginseng C. A. Meyer and identification of active compounds [J]. J Korean Med Sci, 2001, 16 Suppl: S6-18.
- [8] 张晓平, 马大龙, 陈新梅. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤及其作用机制研究进展[J]. 中国执业药师, 2012, 9(11): 52-56.
- [9] 张翔, 叶宝东, 陈丹, 等. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 328-330.
- [10] 熊明华. 人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及 Bcl-2/bax 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(3): 34-36.
- [11] 罗涛, 石孟琼, 刘雄, 等. 薤白总皂苷对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖

- 与凋亡作用的影响[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(10): 762-765.
- [12] 牛珂, 鲁永鲜, 李宁, 等. 人参皂苷 Rg3 对人宫颈癌 HeLa 细胞的诱导凋亡作用[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(7): 1345-1347.
- [13] He BC, Gao JL, Luo X, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling[J]. Int J Oncol, 2011, 38(2): 437-445.
- [14] Kim BJ, Nah SY, Jeon JH, et al. Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric Cancer cells[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(4): 233-239.
- [15] Chwikowska A, Kulbacka J, Saczko J. Death of tumor cells. Photodynamic reaction in apoptosis induction in cancer cells[J]. Pol Merkur Lekarski, 2011, 30(175): 45-48.

(收稿日期: 2013-05-24)