

人参皂甙Rg1对体外人胃癌细胞增殖的抑制作用及机制

商 义^{1,2} 张才全^{1*}

(¹重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016; ²川北医学院, 南充 637000)

摘要 本研究用不同浓度人参皂甙Rg1作用人胃癌BGC-823细胞24 h、48 h和72 h, 采用MTT法、流式细胞术及半定量RT-PCR检测GS-Rg1对胃癌细胞的增殖抑制作用、细胞周期分布时相和*p16^{INK4a}*、*p21^{WAF1}* mRNA表达水平的影响, 以探讨人参皂甙Rg1对人胃癌BGC-823细胞增殖的抑制作用及机制。结果表明, 随着作用时间和浓度的增加, 人参皂甙Rg1对胃癌细胞增殖抑制作用逐渐增强($P < 0.05$), G₀/G₁期细胞比例增加, G₂/S期细胞比例下降, *p16^{INK4a}*、*p21^{WAF1}*基因水平上调。上述结果提示人参皂甙Rg1能抑制体外培养的胃癌BGC-823细胞增殖, 其机制可能与上调肿瘤细胞内细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子*p16^{INK4a}*及*p21^{WAF1}* mRNA的表达有关。

关键词 胃癌; BGC-823; 人参皂甙Rg1; 细胞周期

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度高, 5年生存率低, 易发生腹腔广泛转移。手术治疗、化学疗法和放射性治疗一直以来是治疗恶性肿瘤的主要手段, 但是手术切除肿瘤后并不能控制其复发与转移, 化学疗法在杀伤恶性细胞的同时对正常细胞也有杀伤作用, 并且化疗药物价格大多昂贵, 毒副作用较大。现代医学研究表明, 人参具有抗肿瘤、延缓衰老、抗辐射、提高机体免疫力等多种生物学活性。人参皂甙是人参中主要的活性成分之一。近年来研究多集中于人参皂甙单体Re、Rh1、Rh2、Rg3等。人参皂甙Rg1关于其抗肿瘤作用虽屡有报道, 但对其作用机制的深入研究却很少。本研究通过体外培养的人胃癌BGC-823细胞, 观察人参皂甙Rg1对其细胞周期及细胞周期调控因子*p16^{INK4a}*、*p21^{WAF1}* mRNA表达的影响, 探讨人参皂甙Rg1抑制人胃癌细胞增殖的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人参皂甙Rg1 (MW=801.01Da, 纯度>98%)由吉林宏久生物提供。人胃癌细胞株BGC-823引自川北医学院分子生物研究所, 冻存在-70℃的液氮中。cDNA第一链合成试剂盒(2×Taq Plus PCR Master-Mix)、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒由TIAN-

GEN提供。*p16^{INK4a}*、*p21^{WAF1}*及 β -actin上下游引物由大连宝生物工程有限公司合成。

*p21^{WAF1}*上游引物为: 5'-GAG GAA GAC CAT GTG GAC -3', 下游引物为: 5'-CAG CAC TCT TAG GAA CCT C-3', 扩增片段长度401 bp。*p16^{INK4a}*上游引物为: 5'-GAA TAG TTA CGG TCG GAG-3', 下游引物为: 5'-CGG TGA CTG ATG ATC TAA G-3', 扩增片段长度401 bp。 β -actin上游引物为: 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3', 下游引物为: 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3', 扩增片段长度226 bp。

1.2 实验仪器及器材

NikonTS100倒置荧光相差显微镜, Heraeus-D37520多功能冷冻离心机, BB5060uv二氧化碳孵箱, vs1300l-u洁净工作台, Model550酶标仪, 96孔和6孔细胞培养板, 流式细胞检测仪Epics xl-mcl等。

1.3 细胞培养

使用含有10%新生牛血清的1640细胞培养液, 在37℃、5% CO₂孵箱中培养。

1.4 细胞形态

生长旺盛的胃癌细胞按密度 2.5×10^4 /ml接种于内

含盖玻片的6孔培养板中。分别用5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、80 $\mu\text{g/ml}$ GS-Rg1处理细胞,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养72 h,取出盖玻片细胞进行HE染色,光学显微镜下观察细胞形态(图1)。

1.5 生长曲线

生长旺盛的胃癌细胞经0.25%胰蛋白酶消化后,按密度 $1 \times 10^4/\text{ml}$,接种于96孔细胞培养板中。分别用5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、40 $\mu\text{g/ml}$ 、80 $\mu\text{g/ml}$ GS-Rg1处理细胞,每组4孔,并设对照组。连续培养72 h。于接种后24 h、48 h、72 h应用MTT法,于570 nm波长处利用酶标仪检测各组细胞的吸光度值,取均值绘制生长曲线。

1.6 细胞周期分析

生长旺盛的胃癌细胞按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度,接种于6孔培养板中,加入40 $\mu\text{g/ml}$ GS-Rg1,重复3孔,并设对照组。连续培养72 h后取样。取样时1 000 r/min,

5 min,离心收集细胞,两次。中间用0.01 mol/L PBS (pH7.4)洗涤细胞两次。加入5 ml PBS,让细胞水浴15 min。离心弃上清,弹松细胞沉淀,加入1 ml DNA染液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色30 min。在流式细胞仪上分析细胞周期。

1.7 RT-PCR检测*p16^{INK4a}* mRNA、*p21^{WAF1}* mRNA表达水平

按TIANGEN RNA提取试剂盒操作说明书提取BGC-823细胞RNA。按下述方法迅速合成cDNA:取模板RNA 2 μl ,在冰上解冻,依次加入10 \times RT mix(包含RNasin和DTT)2 μl 、dNTP混合液2 μl 、RNase-free水11 μl 、Quant Reverse Transcriptase 1 μl 、Oligo-dT₁₅ 2 μl 彻底混匀,涡旋振荡3~5 s。简短离心,置于冰上。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

PCR反应体系如下: cDNA模板 2 μl , 2.5 \times Taq PCR Master Mix 9 μl , 上、下游引物各0.25 μl , RNase

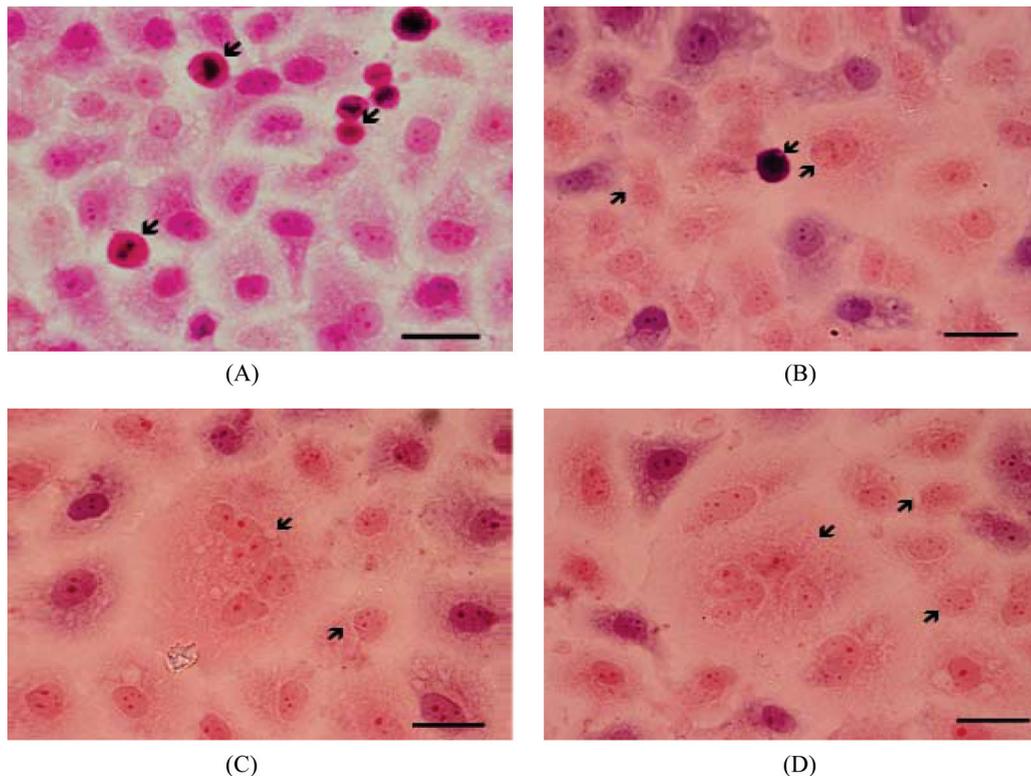


图1 不同浓度Rg1作用72小时后BGC-823细胞形态(HE染色)

A: 对照组; \blacktriangleleft : 处于分裂期的细胞; B: 10 $\mu\text{g/ml}$ 组; \blacktriangleleft : 退化细胞; \blacktriangleright : 细胞嗜酸性增强; C: 40 $\mu\text{g/ml}$ 组; \blacktriangleleft : 多核细胞(由多个退化细胞组成); \blacktriangleright : 细胞嗜酸性增强; D: 80 $\mu\text{g/ml}$ 组; \blacktriangleleft : 多核细胞; \blacktriangleright : 细胞嗜酸性增强; 标尺=20 μm 。

Fig.1 Morphological changes of BGC-823 cells treated with different concentrations of GS-Rg1 at 72 h

A: control group; \blacktriangleleft : cells in the dividing phase; B: 10 $\mu\text{g/ml}$ group; \blacktriangleleft : degenerated cell; \blacktriangleright : enhanced eosinophilic cell; C: 40 $\mu\text{g/ml}$ group; \blacktriangleleft : multi-nucleated cell (consisting of degenerated cells); \blacktriangleright : enhanced eosinophilic cell; D: 80 $\mu\text{g/ml}$ group; \blacktriangleleft : larger multi-nucleated cell; \blacktriangleright : enhanced eosinophilic cell; Scale bar = 20 μm .

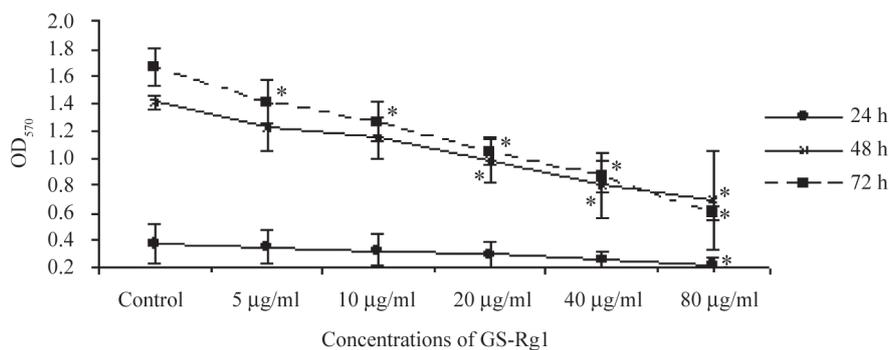


图2 不同浓度GS-Rg1作用24 h、48 h和72 h后BGC-823细胞的生长曲线
与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig.2 Growth curves of BGC-823 cells treated with different concentrations of GS-Rg1 at 24 h, 48 h and 72 h

Compared with control group, * $P < 0.05$.

表1 不同浓度GS-Rg1作用48 h对BGC-823细胞周期分布的影响

Table 1 Effect of increasing concentrations of GS-Rg1 on cell cycle in BGC-823 cells at 48 h

细胞周期	对照组	5 µg/ml 组	20 µg/ml 组	40 µg/ml 组
Cell cycle	Control group	5 µg/ml group	20 µg/ml group	40 µg/ml group
G ₁ /G ₀	58.25±1.39	65.41*±1.44	67.27*±0.62	75.15*±2.56
S	26.35±1.14	22.3±0.95	23.5±0.08	18.9±1.06
G ₂ /M	15.47±2.02	12.22±2.41	9.28±0.7	6.06±3.40

-free水9.5 µl, 使反应体系终体积为25 µl, 离心混匀。首先94℃变性3 min, 以后每次循环包括: 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min、72℃ 5 min共35个循环。退火72℃ 5 min。

PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳, 数字化凝胶成像分析系统对基因条带进行扫描成像, Quantity One软件(Bio Rad)分析电泳图上每条基因条带光密度值。计算各个样本的强度与内参的比值。实验重复3次。

1.8 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件, 与对照组比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

细胞涂片经HE染色后观察。与对照组比较, 经不同浓度GS-Rg1作用于胃癌BGC-823细胞72 h后, 细胞数目减少而排列较松散, 细胞体积明显增大、空泡化, 细胞嗜酸性增强, 出现少量退化细胞和多核细胞(由数个退化细胞组成)。对照组细胞中可见大量

正处于分裂期的细胞(图1)。

2.2 生长曲线

在含有10%新生牛血清的1640细胞培养液培养72 h, MTT法检测细胞增殖情况, 取均值绘制细胞生长曲线。发现GS-Rg1对BGC-823细胞有生长抑制作用, 并呈时间-剂量依赖性关系, * $P < 0.05$ (图2)。

2.3 流式细胞仪检测

细胞周期分析发现, 随着GS-Rg1浓度的增加, G₀/G₁期细胞数增加。与对照组相比, 20 µg/ml、40 µg/ml GS-Rg1作用48 h后G₁期细胞百分比显著升高, * $P < 0.05$ (表1)。

2.4 GS-Rg1对p16^{INK4a}、p21^{WAF1} mRNA表达水平的影响

提取的各组细胞的RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀比值在1.8~2.0之间, 说明RNA纯度较高, 完全可以满足RT-PCR。1%琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S和5S三条带, 说明提取的RNA有较好的完整性。

用数字化凝胶成像分析系统分析发现用5 µg/ml、20 µg/ml、40 µg/ml GS-Rg1处理的BGC-823细胞, 随着时间的延长和浓度的增加, p16^{INK4a} mRNA、p21^{WAF1}

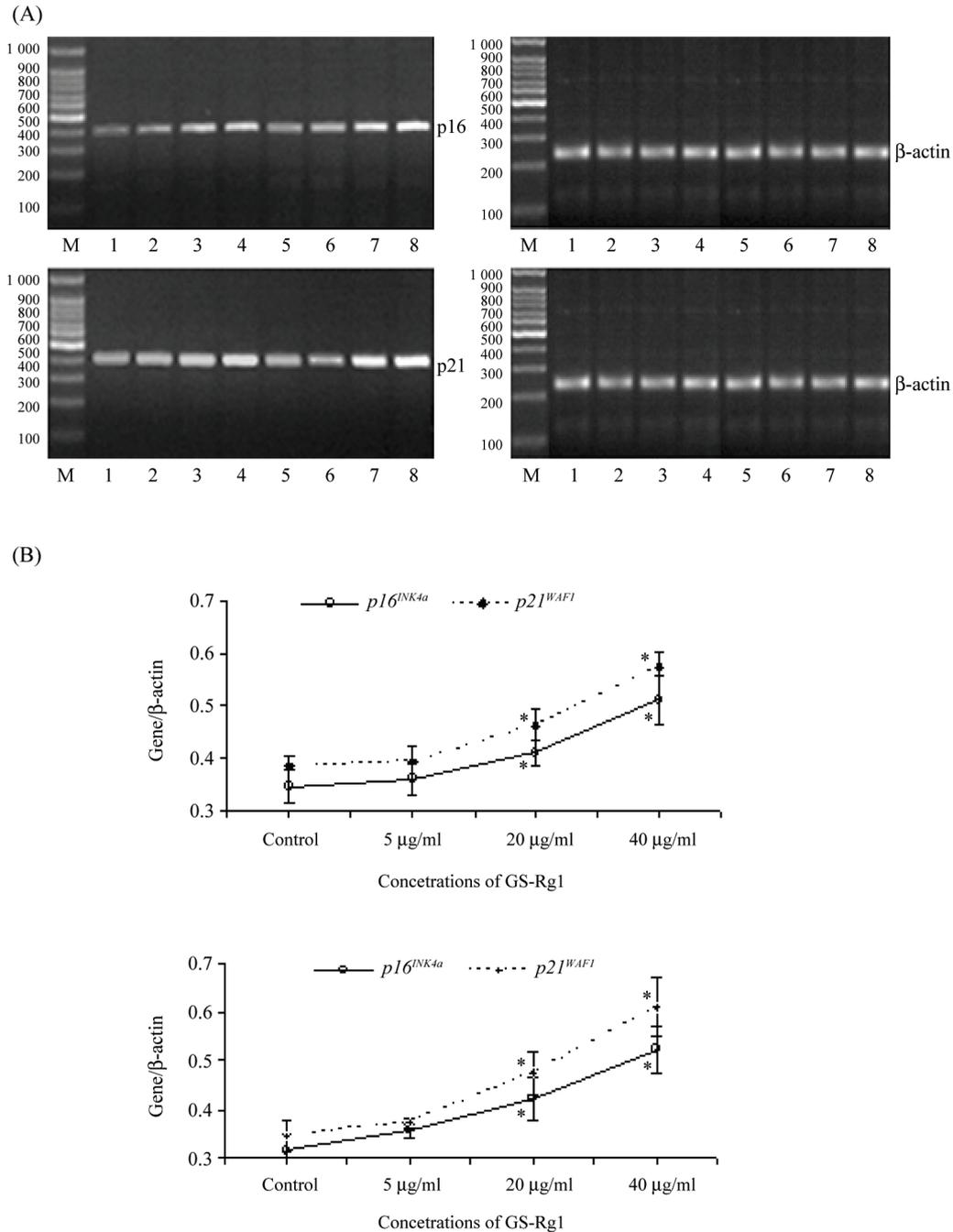


图3 $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF1}$ mRNA的表达水平

A: $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{WAF1}$ mRNA的RT-PCR结果; M: DNA Marker; 1、2、3、4: 分别为48 h对照组、Rg1 5 μ g/ml组、Rg1 20 μ g/ml组和Rg1 40 μ g/ml组; 5、6、7、8: 分别为72 h对照组、Rg1 5 μ g/ml组、Rg1 20 μ g/ml组和Rg1 40 μ g/ml组; B: $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{WAF1}$ mRNA相对表达水平分析(与对照组相比, * $P < 0.05$)。

Fig.3 The expression levels of $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF1}$ mRNA

A: RT-PCR results of $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF1}$ mRNA; M: DNA marker; 1, 2, 3, 4: 48 h of control group, 5 μ g/ml group, 20 μ g/ml group, 40 μ g/ml group, respectively; 5, 6, 7, 8: 72 h of control group, 5 μ g/ml group, 20 μ g/ml group, 40 μ g/ml group, respectively; B: relative levels of $p16^{INK4a}$ and $p21^{WAF1}$ mRNA expressions of BGC-823 cells treated with different concentrations of GS-Rg1 for different time (compared with control group, * $P < 0.05$).

mRNA表达水平逐渐增强, 20 μ g/ml、40 μ g/ml GS-Rg1处理48 h和72 h后 $p16^{INK4a}$ 、 $p21^{WAF1}$ mRNA的表达水平较对照组均显著升高(图3)。

3 讨论

人参为五加科人参属植物人参 *Panax Ginseng* C.A.Mey的干燥根, 全身均可入药。人参的药理活性

成分较多, 包括皂甙、蛋白质、多肽、氨基酸、有机酸、维生素、脂溶性成分等。有关研究表明Rh2具有明显的抗增殖、抗转移的作用^[1,2]。任晓辉^[3]、陈声武^[4]等的研究已证明一定浓度的人参皂甙Rg1(GS-Rg1)能抑制多种恶性细胞的增殖包括小鼠宫颈癌214(U14)、艾氏腹水癌(EAC)、HeLa细胞。本研究中MTT结果显示不同浓度GS-Rg1能抑制细胞的生长, 80 $\mu\text{g/ml}$ GS-Rg1第2天抑制率可达到50%, 并且随着时间的延长抑制作用越明显, 与浓度呈量比关系, 这与曾小丽等^[5]研究G-Rh2对SMMC-7721细胞的抑制作用具有时间和浓度依赖性, 随着G-Rh2作用时间的延长和浓度的升高, 对SMMC-7721细胞的抑制作用增强一致。王红宁等^[6]研究证明, 人参皂甙单体Rb1、Rg1在体外对K562细胞增殖均有明显的抑制作用, 在20~160 $\mu\text{mol/L}$ Rb1和5~20 $\mu\text{mol/L}$ Rg1浓度范围内, 其抑制作用呈浓度依赖性, 且均在作用48 h时抑制率达高峰。雷铁池等^[7]观察了人参皂甙Rg1能使部分体外培养鼠黑色素瘤细胞发生典型的凋亡细胞的形态改变。石松林等^[8]用人参皂甙Rg1处理MG-63细胞后光镜、电镜下观察到多核细胞和癌巨细胞明显减少, 核质比例减小, 核内核仁数目减少, 核内异染色质团块较对照组明显减少, 常染色质增多。本研究中, 与对照组相比, 细胞数目明显减少, 细胞体积明显增大, 空泡化, 出现多核细胞、凋亡细胞。这与上述结果相似(图1)。

以往研究证实了在分化程度低, 有淋巴结转移的进展期胃癌中发生了 $p16^{\text{INK4a}}$ 基因的缺失和 $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白低表达^[9,10]。胃癌的晚期中有 $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白表达缺失^[11]。 $p16$ 作为CDK的抑制蛋白, 其功能似闸门作用, 调控着细胞周期的演进及细胞生长分化^[12]。 $p16^{\text{INK4a}}$ 作为肿瘤的抑制基因竞争性地同CDK4结合。而CDK4与cyclin的复合体参与 G_1 -S转换的调控, $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白抑制CDK4活性, 最终阻止细胞进入S期。有关实验表明 $p21^{\text{WAF1}}$ 参与了抗肿瘤过程^[13]。 $p21^{\text{WAF1}}$ 基因的表达产物 $p21^{\text{WAF1}}$ 蛋白是一种抑制激酶活性的细胞周期抑制蛋白, 可与大多数cyclin-CDK复合物结合, 广泛地抑制各种cyclin-CDK复合物。在本研究中, 不同浓度的GS-Rg1作用BGC-823细胞48 h、72 h后, 上调 $p16^{\text{INK4a}}$ mRNA的表达, 其编码的蛋白质 $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白作为直接控制细胞增殖周期的细胞内固有蛋白, 竞争性地同CDK4结

合, 从而抑制CDK4活性, 阻止细胞进入S期; 上调 $p21^{\text{WAF1}}$ mRNA的表达, 其编码的蛋白质 $p21^{\text{WAF1}}$ 蛋白可能通过抑制cyclinD1-CDK4和cyclinE-CDK2的活性, 使Rb蛋白不能发生磷酸化, 不能促进转录因子的生成, 从而抑制DNA合成, 使细胞周期停滞在 G_1 期。

由此可见, GS-Rg1可以直接作用于肿瘤细胞, 抑制其增殖。并且通过上调 $p16^{\text{INK4a}}$ 、 $p21^{\text{WAF1}}$ mRNA的表达来调节细胞周期、阻滞肿瘤细胞已失去控制的细胞周期, 从而抑制肿瘤细胞的生长。这可能是GS-Rg1抑制人胃癌BGC-823细胞增殖的机制之一。

参考文献(References)

- Oh JI, Chun KH, Joo SH, Oh YT, Lee SK. Caspase-3-dependent protein kinase C delta activity is required for the progression of Ginsenoside-Rh2-induced apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Cancer Lett* 2005; 230(2): 228-38.
- Cheng CC, Yang SM, Huang CY, Chen JC, Chang WM, Hsu SL. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh2-mediated G_1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Chemother pharmacol* 2005; 55(6): 531-40.
- 任晓辉, 王伟. 人参皂甙Rg1药效研究新进展. *农垦医学* 2008; 30(2): 136-8.
- 陈声武, 王岩, 王毅, 王丽娟, 何忠梅, 王本祥. 人参皂甙Rg1和Rh1抗肿瘤作用的研究. *吉林大学学报* 2003; 29(1): 25-8.
- 曾小莉, 涂植光. 人参总皂甙诱导人肝癌细胞分化初探. *肿瘤防治研究* 2000; 27: 188-90.
- 王红宁, 左国伟, 李春莉, 官涛, 姜蓉, 陈地龙, 等. 人参皂甙单体Rb1及Rg1对白血病细胞K562增殖的影响. *中国组织工程研究与临床康复* 2009; 13(40): 7829-32.
- 雷铁池, 朱文元. 人参皂甙Rg1对体外培养鼠黑色素瘤细胞的化疗增敏作用. *中华皮肤科杂志* 2000; 33(5): 338-41.
- 石松林, 李祺福, 王国红, 马宗源, 王建陆, 林昌健. 人参皂甙Rg1对成人骨肉瘤MG-63细胞形态结构和终末分化指标的影响. *厦门大学学报* 2009; 48(3): 392-5.
- 陈广斌, 武步强, 白骏恒, 马雪平. $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白表达与胃癌及淋巴结转移的关系. *长治医学学报* 2001; 15(3): 161-2.
- 秦克旺. $p16^{\text{INK4a}}$ 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. *江西医学院学报* 2001; 41(1): 112-3.
- 白骏恒, 肖鹏, 陈广斌. $p16^{\text{INK4a}}$ 和P15蛋白表达与胃癌的关系. *长治医学院学报* 2002; 16(4): 249-51.
- 陆哲明. $p16^{\text{INK4a}}$ 抑癌基因的发现及研究. *国外医李肿瘤学分册* 1995; 22(6): 321-3.
- 郑世营, 葛锦锋, 沈振亚, 赵军, 秦涌. 腺病毒介导 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 基因转移及诱导胃癌细胞凋亡. *中国癌症杂志* 2002; 12(1): 9-12.

Inhibiting Effects and Its Mechanisms of Ginsenoside Rg1 on Human Gastric Cancer Cell Line *in vitro*

Yi Shang^{1,2}, Cai-Quan Zhang^{1*}

¹Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract To explore the inhibitory effects of ginsenoside Rg1 on the human gastric carcinoma cell line BGC-823 *in vitro*, 24, 48 and 72 h after treated with different concentration of GS-Rg1, the cell proliferation of the BGC-823 cells was valuated by MTT assay, cell cycle distribution was measured by flow cytometric analysis and the expression of *p16^{INK4a}* and *p21^{WAF1}* genes mRNA were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). Results showed that with the increase of concentration of GS-Rg1 and the duration of administration, the inhibitory effects were elevated ($P < 0.05$). The proportion of cells in G₀/G₁ phase was obviously increased whereas that in G₂/S phase was decreased. The expression of *p16^{INK4a}* and *p21^{WAF1}* genes mRNA were upregulated. These results suggested that GS-Rg1 can inhibit the proliferation of BGC-823 cells *in vitro* by upregulating the expression of *p16^{INK4a}* and *p21^{WAF1}* genes mRNA.

Key words gastric cancer; BGC-823; Ginsenoside Rg1; cell cycle

Received: July 2, 2010 Accepted: November 25, 2010

*Corresponding author. Tel: 13618393893, E-mail: caiquanzhang@foxmail.com