

## 人参皂苷 Rg3 靶向 Wnt/β-连环蛋白信号通路调控胃癌顺铂耐药性

孟子琪<sup>1</sup>, 张睿<sup>1</sup>, 吴旭微<sup>1</sup>, 金铁峰<sup>1</sup>, 张美花<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 延边大学医学院肿瘤研究中心, 吉林延吉 133000

<sup>2</sup> 延边大学附属医院健康体检科, 吉林延吉 133000

通信作者: 张美花 电话: 0433-2435006 电子邮件: zhangmeihua81@hotmail.com

**摘要:** 目的 探讨人参皂苷 Rg3 联合顺铂 (DDP) 对 DDP 耐药细胞 SGC-7901/DDP 的抑制作用及其分子机制。方法 将 SGC-7901/DDP 细胞分为 4 组: 对照组、人参皂苷 Rg3 (40 μg/ml) 治疗组、DDP (1.40 μg/ml) 治疗组及联合治疗组。采用 MTT、EdU 和平板克隆形成实验检测 SGC-7901/DDP 细胞增殖能力, 流式细胞术和 Hoechst 33342 染色法检测 SGC-7901/DDP 细胞凋亡能力, Western blot 检测凋亡相关标志物的表达, 细胞划痕和 Transwell 实验检测 SGC-7901/DDP 细胞迁移能力, Western blot 和免疫荧光染色检测上皮-间充质转化 (EMT) 和 Wnt/β-连环蛋白 (β-catenin) 信号通路相关标志物的表达水平。结果 与人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组比较, 联合治疗组显著抑制 SGC-7901/DDP 细胞的增殖 ( $t = 8.062, P = 0.001; t = 7.090, P = 0.002$ )、克隆形成 ( $t = 8.062, P = 0.001; t = 6.144, P = 0.004$ ) 和迁移能力 ( $t = 7.424, P = 0.002; t = 4.317, P = 0.013$ ), 同时促进细胞的凋亡能力 ( $t = 5.530, P = 0.031; t = 6.036, P = 0.026$ )。与人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组比较, 联合治疗组显著抑制 EMT 相关蛋白波形蛋白 ( $t = 24.450, P < 0.001; t = 14.750, P < 0.001$ )、Snail ( $t = 29.640, P < 0.001; t = 70.700, P < 0.001$ )、Slug ( $t = 89.230, P < 0.001; t = 87.360, P < 0.001$ )、基质金属蛋白酶 (MMP) 2 ( $t = 84.540, P < 0.001; t = 67.120, P < 0.001$ )、MMP9 ( $t = 19.010, P < 0.001; t = 10.890, P < 0.001$ ) 及 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白 Wnt ( $t = 35.480, P < 0.001; t = 14.670, P < 0.001$ )、β-catenin ( $t = 155.800, P < 0.001; t = 118.100, P < 0.001$ )、C-myc ( $t = 20.870, P < 0.001; t = 3.334, P = 0.029$ )、细胞周期蛋白 D1 ( $t = 5.007, P = 0.008; t = 8.347, P = 0.001$ ) 的表达, 同时显著上调上皮细胞相关蛋白 E 钙黏蛋白 ( $t = 36.450, P < 0.001; t = 33.810, P < 0.001$ ) 和 ZO-1 ( $t = 37.060, P < 0.001; t = 37.030, P < 0.001$ ) 的表达。结论 人参皂苷 Rg3 通过抑制 Wnt/β-catenin 信号通路活性, 增强 SGC-7901/DDP 细胞对 DDP 的敏感性。

关键词: 人参皂苷 Rg3; 顺铂; 增殖; 上皮-间充质转化; Wnt/β-连环蛋白

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2022)03-0366-11

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.14775

## Ginsenoside Rg3 Regulates Cisplatin Resistance in Gastric Cancer by Wnt/β-catenin Signaling Pathway

MENG Ziqi<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, WU Xuwei<sup>1</sup>, JIN Tiefeng<sup>1</sup>, ZHANG Meihua<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Center, Medical College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China

<sup>2</sup> Department of Health Examination Centre, Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China

Corresponding author: ZHANG Meihua Tel: 0433-2435006, E-mail: zhangmeihua81@hotmail.com

**ABSTRACT: Objective** To investigate the inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cisplatin (DDP) on DDP-resistant cell line SGC-7901/DDP and their molecular mechanism. **Methods** SGC-7901/DDP cells were divided into four groups including a control group, a ginsenoside Rg3 (40 μg/ml) treatment group, a

基金项目: 国家自然科学基金 (81960554) Supported by the National Natural Science Foundation of China (81960554)

DDP (1.40 μg/ml) treatment group, and a drug combination treatment group. The proliferation ability of SGC-7901/DDP cells was detected by MTT, EdU, and colony formation assays. The apoptosis ability of SGC-7901/DDP cell was detected by flow cytometry and Hoechst 33342 staining. The protein levels of apoptosis-related markers were detected by Western blotting. The migration ability of SGC-7901/DDP cells was detected by wound healing and Transwell assays. The expression levels of proteins in epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and Wnt/β-catenin signaling pathway were determined by Western blotting and immunofluorescence staining. **Results** Compared with the ginsenoside Rg3 or the DDP treatment groups, the drug combination treatment group inhibited the proliferation ( $t = 8.062, P = 0.001$ ;  $t = 7.090, P = 0.002$ ), colony formation ( $t = 8.062, P = 0.001$ ;  $t = 6.144, P = 0.004$ ), and migration ( $t = 7.424, P = 0.002$ ;  $t = 4.317, P = 0.013$ ), and promoted the apoptosis ( $t = 5.530, P = 0.031$ ;  $t = 6.036, P = 0.026$ ) of SGC-7901/DDP cells. Compared with the ginsenoside Rg3 and the DDP treatment groups, the drug combination treatment group down-regulated the expression levels of EMT-associated proteins including vimentin ( $t = 24.450, P < 0.001$ ;  $t = 14.750, P < 0.001$ ), Snail ( $t = 29.640, P < 0.001$ ;  $t = 70.700, P < 0.001$ ), Slug ( $t = 89.230, P < 0.001$ ;  $t = 87.360, P < 0.001$ ), matrix metalloproteinase (MMP) 2 ( $t = 84.540, P < 0.001$ ;  $t = 67.120, P < 0.001$ ), and MMP9 ( $t = 19.010, P < 0.001$ ;  $t = 10.890, P < 0.001$ ), as well as those of Wnt/β-catenin signaling pathway related proteins including Wnt ( $t = 35.480, P < 0.001$ ;  $t = 14.670, P < 0.001$ ), β-catenin ( $t = 155.800, P < 0.001$ ;  $t = 118.100, P < 0.001$ ), C-myc ( $t = 20.870, P < 0.001$ ;  $t = 3.334, P = 0.029$ ), and cyclin D1 ( $t = 5.007, P = 0.008$ ;  $t = 8.347, P = 0.001$ ). Meanwhile, it up-regulated the expression of epithelial cells including E-cadherin ( $t = 36.450, P < 0.001$ ;  $t = 33.810, P < 0.001$ ) and ZO-1 ( $t = 37.060, P < 0.001$ ;  $t = 37.030, P < 0.001$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rg3 enhanced the sensitivity of SGC-7901/DDP cells to DDP by inhibiting the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway.

**Key words:** ginsenoside Rg3; cisplatin; proliferation; epithelial-mesenchymal transformation; Wnt/β-catenin

*Acta Acad Med Sin*, 2022, 44(3):366-376

胃癌是消化道系统最常见的恶性肿瘤之一，每年有超过 100 万的新发病例<sup>[1]</sup>。尽管胃癌诊断和治疗水平已取得了进步，但患者 5 年生存率仅约为 25%。术后辅助放化疗是预防复发转移和提高患者长期生存率的重要治疗手段，然而其不良反应和肿瘤细胞的耐药性是影响化疗效果的关键因素<sup>[2]</sup>。因此，寻求解决肿瘤细胞耐药的有效途径，是癌症临床治疗的热点之一。人参皂苷 Rg3 是从中药人参中提取的四环三萜单体，具有多种药理作用<sup>[3]</sup>。研究表明，人参皂苷 Rg3 可诱导肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤细胞增殖、迁移、血管形成和耐药性等<sup>[4-5]</sup>。人参皂苷 Rg3 已作为一种有效的抗肿瘤药物，应用于肺癌、乳腺癌、肝癌和卵巢癌等恶性肿瘤的治疗<sup>[6-9]</sup>。Wnt/β-连环蛋白（β-catenin）信号通路，又称经典 Wnt 信号通路，是一个保守的信号轴，参与细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等多种病理生理过程<sup>[10]</sup>。研究表明，靶向 Wnt/β-catenin 信号通路可抑制多种癌症干细胞自我更新、细胞增殖和分化等。目前关于人参皂苷 Rg3 对胃癌顺铂（cisplatin, DDP）耐药作用影响的文献报道较少，本研究通过分析人参皂

苷 Rg3 对 DDP 耐药细胞株 SGC-7901/DDP 的增殖、凋亡、迁移及上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）进程的影响，探究其抑制胃癌细胞株耐药性的具体分子机制，为临床治疗胃癌 DDP 耐药提供理论依据。

## 材料和方法

**材料和试剂** 1640 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清均购自以色列 Biological Industries 公司，顺铂购自江苏豪森药业集团有限公司，人参皂苷 Rg3 购自上海源叶生物科技有限公司，MTT 购自杭州碧云天生物技术有限公司，ECL 化学发光试剂盒和鼠抗人 β-actin 单克隆抗体均购自康为世纪生物科技有限公司，EdU 试剂盒购自广州锐博生物技术有限公司，Annexin V/PI 凋亡试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司，兔抗人活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cysteinyl aspartate specific proteinase, Caspase-3）、活化的 Caspase-8、E 钙黏蛋白（E-cadherin）和转录因子 Snail 克隆抗体均购自美

国 Cell Signaling Technology 公司，鼠抗人 Bax、Bcl2、ZO-1、波形蛋白（Vimentin）、转录因子 Slug、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMP）2、MMP9、Wnt、 $\beta$ -catenin、C-myc 和细胞周期蛋白 D1（Cyclin D1）单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司，辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司，Alexa Fluor<sup>®</sup>568 标记的山羊抗鼠 IgG（H + L）购自美国 Invitrogen 公司。

**细胞培养** 人胃黏膜细胞 GES-1、人胃癌细胞 SGC-7901 及 DDP 耐药细胞 SGC-7901/DDP 均由延边大学肿瘤研究中心提供。将细胞置于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗（100 U/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素）的 1640 培养基中，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养，待细胞贴壁至 80% ~ 90% 融合度时传代，取对数生长期的细胞进行后续实验。

**MTT 法检测细胞活力** 取对数生长期的人胃黏膜细胞 GES-1、人胃癌细胞 SGC-7901 和 SGC-7901/DDP 常规消化制成悬液，以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中，置于培养箱中培养 24 h 后更换培养基，分别加入浓度为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2  $\mu$ g/ml 的 DDP 和浓度为 0、10、20、40、80、160  $\mu$ g/ml 的人参皂苷 Rg3，置于培养箱中培养 48 h。每孔加入 100  $\mu$ l 的 MTT（1  $\mu$ g/ml），培养 4 h。每孔加入 100  $\mu$ l 二甲基亚砜，酶标仪测量 490 nm 波长处吸光值。细胞存活率 = 用药组吸光值/对照组吸光值 × 100%，计算 48 h 的半数抑制浓度（median inhibition concentration, IC<sub>50</sub>）。

**平板克隆形成实验** 取对数生长期的 SGC-7901/DDP 细胞以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔板中，置于培养箱中培养。待细胞贴壁时，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞，对照组加入培养基。48 h 后更换新鲜培养基继续培养 15 d，其中每 2 d 更换 1 次培养基，当形成肉眼可见的细胞克隆后终止培养。PBS 洗 3 次，每孔加入 2 ml 甲醇室温固定 20 min，苏木素染色 10 min，蒸馏水冲洗晾干，拍照并统计细胞集落数。

**EdU 细胞增殖实验** 取对数生长期的 SGC-7901/DDP 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板中，置于培养箱中培养 24 h 更换培养基，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。每孔加入 100  $\mu$ l EdU 工作液（5  $\mu$ mol/L）培养 2 h。PBS 洗 2 次，100  $\mu$ l 的 4% 多聚甲醛室温固定 20 min，50  $\mu$ l 甘氨酸（2 mg/ml）孵育 5 min，100  $\mu$ l 的 PBS 脱色 5 min，100  $\mu$ l 的 0.5% Triton X-100 的 PBS

渗透剂孵育 10 min，100  $\mu$ l 的 Apollo 染色反应液室温避光孵育 30 min，100  $\mu$ l 的甲醇孵育 5 min，100  $\mu$ l 的 Hoechst 33342 染色液室温避光孵育 30 min，PBS 洗 3 次。荧光显微镜下拍照。

**流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期的细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板中，置于培养箱中培养 24 h 更换培养基，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。消化离心各组细胞，重悬细胞至密度为  $5 \times 10^5$  个/ml，取 100  $\mu$ l 细胞悬液至 EP 管中，分别加 5  $\mu$ l 的 Annexin V 染料和 5  $\mu$ l 的 PI 染料，室温避光孵育 15 min，分别加 400  $\mu$ l 的 1×结合缓冲液轻轻混匀，用滤网过滤后上机检测并分析。

**Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡** 取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于载有盖玻片的 6 孔板中，置于培养箱中培养 24 h 更换培养基，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。每孔加入 2 ml 的 4% 多聚甲醛室温固定 10 min，PBS 洗 3 次，加入 1 ml 的 Hoechst 33342 染色液（10 mg/L）室温孵育 30 min，PBS 洗 3 次，封片后在荧光显微镜下拍照。

**Western blot 检测** 取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 6 孔板中，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。每孔加入适量含 1% 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上孵育 10 min，刮下细胞于 EP 管中，冰上进行超声破碎裂解细胞。用 BCA 法检测蛋白浓度，加入 5×上样缓冲液，100 °C 变性 5 min。每孔加入 30  $\mu$ g 变性蛋白于 8% SDS-PAGE 分离胶中分离蛋白，以 5  $\mu$ l 的  $\beta$ -actin 为对照，将含有蛋白的分离胶转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，加入相应一抗（1:1000）孵育 PVDF 膜 4 °C 过夜。1×TBST 洗膜 3 次，加入对应属性的二抗（1:3000）室温孵育 2 h，1×TBST 洗膜 3 次，ECL 化学发光试剂显影，Image J 分析条带灰度值。

**细胞划痕愈合实验** 取对数生长期的细胞常规消化制成悬液接种于 6 孔板中，置于培养箱中培养，待细胞融合度为 70% ~ 80% 时，用 200  $\mu$ l 无菌枪头在每孔中垂直划痕，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。分别于 0、24、48 h 在显微镜下拍照并计算细胞划痕愈合率。

**Transwell 迁移实验** 取对数生长期的细胞以  $5 \times$

$10^5$ 个/ml 的密度接种于 Transwell 小室内，下室加入 800 μl 培养基，置于培养箱中培养 6 h 后更换培养基，上室分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞，下室加入 800 μl 含 10% 胎牛血清的培养基，置于培养箱中培养 48 h 后取出小室，每孔加入 2 ml 甲醇室温固定 20 min，苏木素染色 10 min，棉签擦拭小室内残留细胞，沿小室边缘切割薄膜，中性树胶封片，显微镜下拍照并统计个数。

**免疫荧光染色** 取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 6 孔板中，分别用人参皂苷 Rg3 和 DDP 单独或联合治疗 SGC-7901/DDP 细胞 48 h，对照组加入等量培养基。每孔分别依次加入 2 ml 的 4% 多聚甲醛室温固定 10 min、2 ml 的 0.5% Triton X-100 室温渗透 10 min、2 ml 的 3% BSA 室温封闭 2 h，再加入 100 μl 的一抗（1:100）4 ℃过夜。PBS 洗 3 次，每孔加入 100 μl 荧光二抗（1:400）室温避光孵育 1 h，含有 DAPI 的封片剂封片，荧光显微镜下拍照。

**统计学处理** 采用 SPSS 26.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差表示，组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。所有实验均独立重复 3 次。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

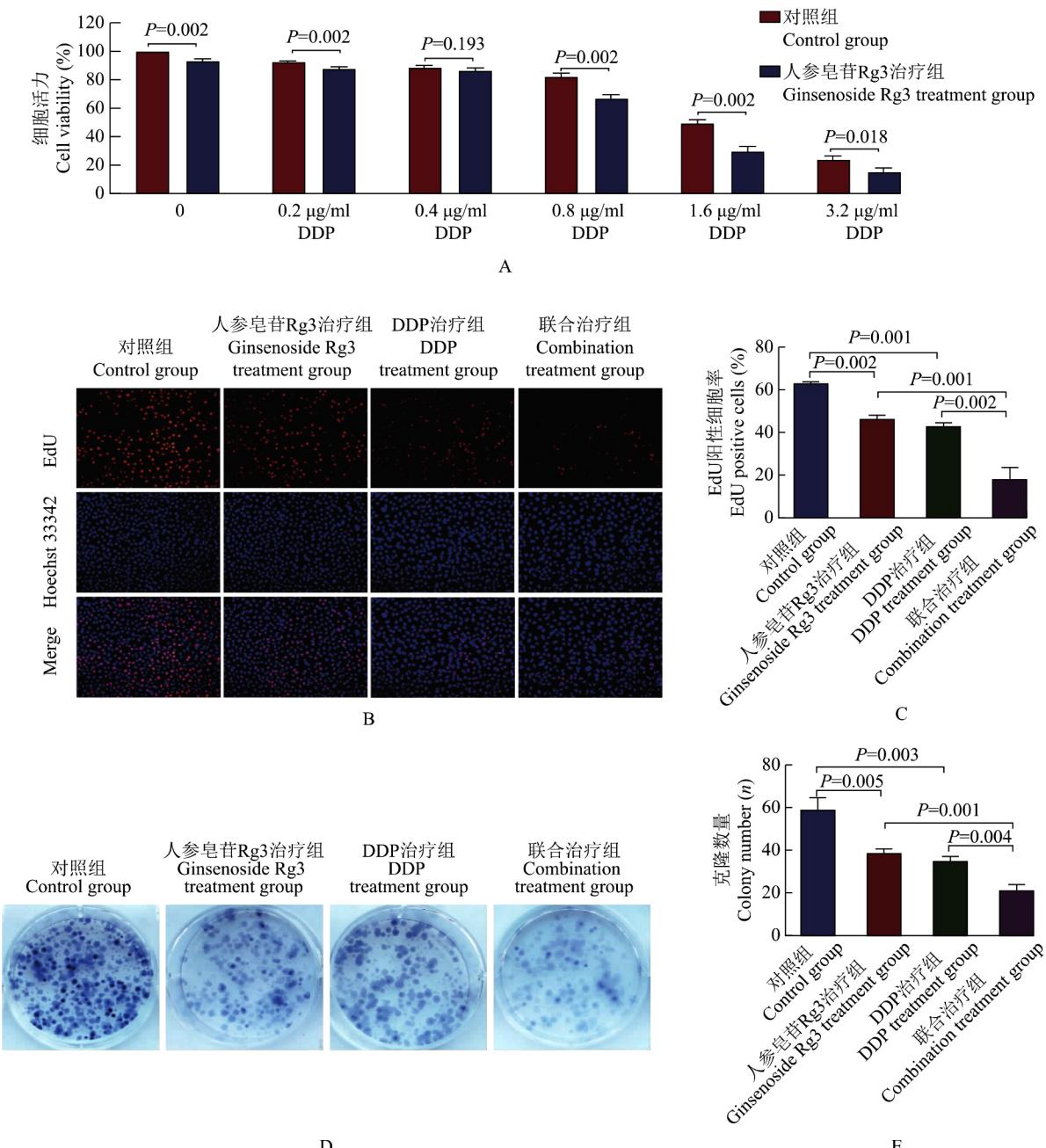
## 结 果

**人参皂苷 Rg3 增强 SGC-7901/DDP 细胞对 DDP 的敏感性** MTT 法检测结果显示，DDP 对 SGC-7901 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 0.65 μg/ml，对 SGC-7901/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 1.40 μg/ml，人参皂苷 Rg3 联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 1.12 μg/ml。与 0 μg/ml 组比较，10、20、40、80、160 μg/ml 人参皂苷 Rg3 处理后 SGC-7901/DDP 细胞活力分别为  $(86.33 \pm 4.51)\%$ 、 $(83.33 \pm 4.04)\%$ 、 $(82.00 \pm 5.29)\%$ 、 $(74.33 \pm 2.52)\%$ 、 $(72.00 \pm 1.73)\%$ ，差异有统计学意义 ( $t = 5.250, P = 0.034$ ； $t = 7.143, P = 0.019$ ； $t = 5.892, P = 0.028$ ； $t = 17.670, P = 0.003$ ； $t = 28.000, P = 0.001$ )；人正常胃黏膜细胞 GES-1 的活力分别为  $(99.67 \pm 0.58)\%$ 、 $(99.33 \pm 1.16)\%$ 、 $(98.33 \pm 1.16)\%$ 、 $(98.00 \pm 1.00)\%$ 、 $(97.67 \pm 1.53)\%$ ，差异无统计学意义 ( $t = 1.000, P = 0.423$ ； $t = 1.000, P = 0.427$ ； $t = 2.500, P = 0.130$ ； $t = 3.464, P = 0.074$ ； $t = 2.646, P = 0.118$ )。40 μg/ml 人参皂苷 Rg3 和 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 μg/ml DDP 联合治疗组的 SGC-7901/DDP 细胞活力明显低于对照组 ( $t = 7.559, P = 0.002$ ； $t = 7.000, P = 0.002$ ； $t = 1.565,$

$P = 0.193$ ； $t = 7.273, P = 0.002$ ； $t = 7.620, P = 0.002$ ； $t = 3.897, P = 0.018$ ) (图 1A)。根据本实验结果，选取 40 μg/ml 人参皂苷 Rg3 和 1.40 μg/ml DDP 用于后续实验。EdU 染色实验结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的细胞增殖率明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组 [ $(18.00 \pm 5.57)\%$  比  $(45.67 \pm 2.08)\%$ ； $t = 8.062, P = 0.001$ ] 和 DDP 治疗组 [ $(18.00 \pm 5.57)\%$  比  $(42.33 \pm 2.08)\%$ ； $t = 7.090, P = 0.002$ ] (图 1B、1C)。平板克隆形成实验结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的克隆形成数量明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组 ( $52.33 \pm 7.51$  比  $95.67 \pm 5.51$ ； $t = 8.062, P = 0.001$ ) 和 DDP 治疗组 ( $52.33 \pm 7.51$  比  $86.67 \pm 6.11$ ； $t = 6.144, P = 0.004$ ) (图 1D、1E)。

**人参皂苷 Rg3 联合 DDP 协同促进 SGC-7901/DDP 细胞凋亡能力** 流式细胞术检测结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的细胞凋亡率明显高于人参皂苷 Rg3 治疗组 [ $(21.59 \pm 5.02)\%$  比  $(5.78 \pm 0.13)\%$ ； $t = 5.530, P = 0.031$ ] 和 DDP 治疗组 [ $(21.59 \pm 5.02)\%$  比  $(10.45 \pm 2.01)\%$ ； $t = 6.036, P = 0.026$ ] (图 2A、2B)。Hoechst 33342 染色结果显示，与单药治疗组比较，联合治疗组凋亡小体数量增多 (图 2C)。Western blot 检测结果显示，与人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组比较，联合治疗组的活化的 Caspase-3 ( $1.31 \pm 0.08$  比  $0.85 \pm 0.01$ ； $t = 9.534, P = 0.007$  和  $1.31 \pm 0.08$  比  $1.03 \pm 0.09$ ； $t = 4.039, P = 0.016$ )、活化的 Caspase-8 ( $1.38 \pm 0.02$  比  $0.82 \pm 0.01$ ； $t = 61.030, P < 0.001$  和  $1.38 \pm 0.02$  比  $0.94 \pm 0.01$ ； $t = 48.390, P < 0.001$ )、Bax/Bcl2 ( $1.63 \pm 0.06$  比  $0.75 \pm 0.01$ ； $t = 27.860, P < 0.001$  和  $1.63 \pm 0.06$  比  $0.87 \pm 0.03$ ， $t = 20.700, P < 0.001$ ) 表达水平显著升高 (图 2D、2E)。

**人参皂苷 Rg3 联合 DDP 协同抑制 SGC-7901/DDP 细胞迁移能力** 细胞划痕实验检测结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的 SGC-7901/DDP 细胞 48 h 迁移率明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组 [ $(10.64 \pm 2.18)\%$  比  $(43.12 \pm 7.26)\%$ ； $t = 7.424, P = 0.002$ ] 和 DDP 治疗组 [ $(10.64 \pm 2.18)\%$  比  $(31.39 \pm 8.04)\%$ ； $t = 4.317, P = 0.013$ ] (图 3A、3B)。Transwell 实验检测结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的 SGC-7901/DDP 细胞的迁移率明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组 [ $(52.33 \pm 7.51)\%$  比  $(95.67 \pm 5.51)\%$ ； $t = 7.140, P = 0.019$ ] 和 DDP 治疗组 [ $(52.33 \pm 7.51)\%$  比  $(86.67 \pm 6.11)\%$ ； $t = 5.179, P = 0.035$ ] (图 3C、3D)。



DDP: 顺铂

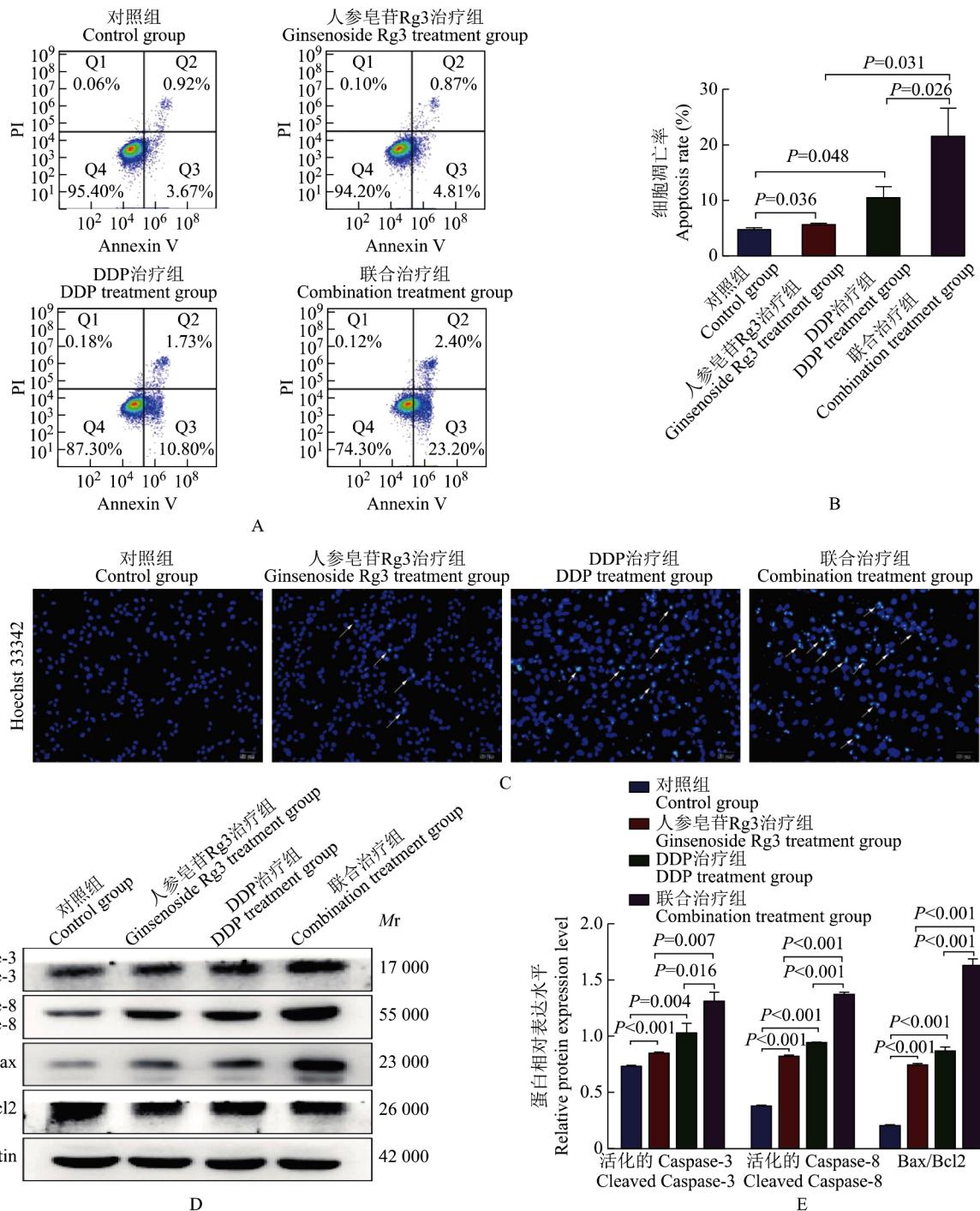
DDP: cisplatin

A. MTT 法检测 40  $\mu\text{g/ml}$  人参皂苷 Rg3 与不同浓度 DDP (0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2  $\mu\text{g/ml}$ ) 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞活力的影响；B. EdU 实验检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞活力的影响 ( $\times 400$ )；C. 不同治疗组的 EdU 阳性细胞率；D. 平板克隆形成实验检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞集落形成能力的影响；E. 不同治疗组的细胞克隆数量

A. MTT assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 (40  $\mu\text{g/ml}$ ) and DDP (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, and 3.2  $\mu\text{g/ml}$ ) treatment alone or in combination on SGC-7901/DDP cell viability; B. EdU assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on SGC-7901/DDP cell viability ( $\times 400$ ); C. EdU positive cell rates in different treatment groups; D. clone formation assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the colony formation ability of SGC-7901/DDP cells; E. number of cell colonies in different treatment groups

图1 人参皂苷 Rg3 联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞活力的影响

Fig 1 Effect of ginsenoside Rg3 combined with DDP on the viability of SGC-7901/DDP cells



Mr: 相对分子质量; Caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

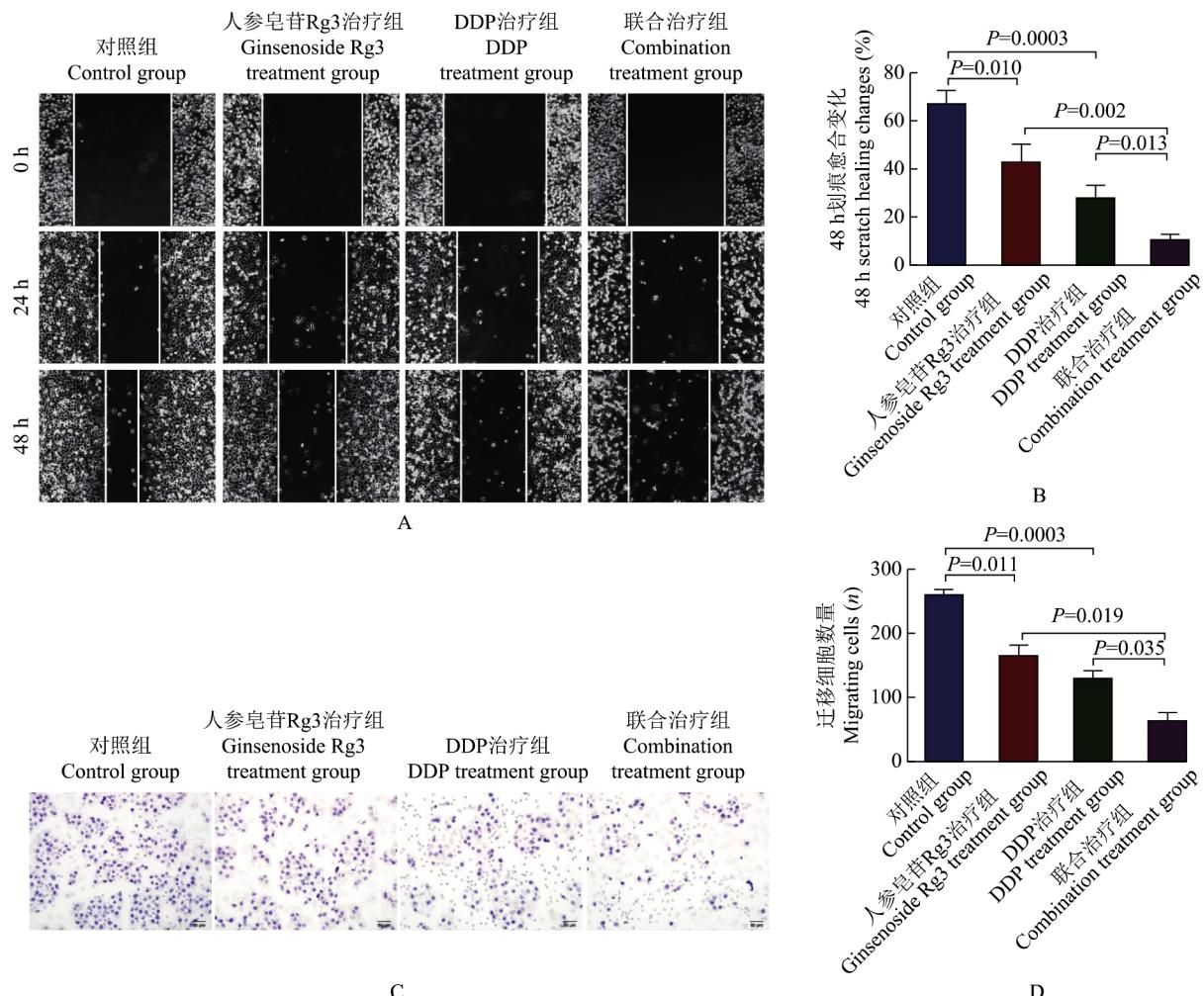
Mr: relative molecular mass; Caspase: cysteinyl aspartate specific proteinase

A. Annexin V/PI 流式细胞术检测人参皂苷 Rg3 单独或联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞凋亡的影响；B. 不同治疗组的细胞凋亡率；C. Hoechst 33342 染色检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞凋亡小体形成的影响；D. Western blot 检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞中活化的 Caspase-3、活化的 Caspase-8、Bax 和 Bcl2 蛋白表达水平的影响；E. 不同治疗组的蛋白表达水平

A. Annexin V/PI flow cytometry assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the apoptosis rate of SGC-7901/DDP cells; B. apoptosis rates in different treatment groups; C. Hoechst 33342 staining assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the apoptotic vesicle formation in SGC-7901/DDP cells; D. Western blotting to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the protein expression levels of cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, Bax, and Bcl2 in SGC-7901/DDP cells; E. protein expression levels in different treatment groups.

图2 人参皂苷 Rg3 联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞凋亡能力的影响

Fig 2 Effect of ginsenoside Rg3 combined with DDP on the apoptosis of SGC-7901/DDP cells



A. 细胞划痕实验检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞迁移能力的影响；B. 不同治疗组的细胞愈合率；C. Transwell 实验检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞迁移能力的影响；D. 不同治疗组的细胞迁移数量  
A. wound healing assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the migration ability of SGC-7901/DDP cells; B. cell healing rates in different treatment groups; C. Transwell assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the migration ability of SGC-7901/DDP cells; D. number of migrating cells in different treatment groups

图3 人参皂苷 Rg3 联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞迁移能力的影响

Fig 3 Effect of ginsenoside Rg3 combined with DDP on the migration ability of SGC-7901/DDP cells

**人参皂苷 Rg3 联合 DDP 协同抑制 SGC-7901/DDP 细胞 EMT 进程** Western blot 检测结果显示，人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的上皮标志物 E-cadherin ( $1.02 \pm 0.01$  比  $0.65 \pm 0.01$ ;  $t = 36.450$ ,  $P < 0.001$  和  $1.02 \pm 0.01$  比  $0.68 \pm 0.01$ ;  $t = 33.810$ ,  $P < 0.001$ ) 和 ZO-1 ( $1.30 \pm 0.04$  比  $0.39 \pm 0.01$ ;  $t = 37.060$ ,  $P < 0.001$  和  $1.30 \pm 0.04$  比  $0.37 \pm 0.01$ ;  $t = 37.030$ ,  $P < 0.001$ ) 蛋白表达水平明显高于人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组；间质标志物 Vimentin ( $0.32 \pm 0.01$  比  $0.56 \pm 0.00$ ;  $t = 24.450$ ,  $P < 0.001$  和  $0.32 \pm 0.01$  比  $0.44 \pm 0.01$ ;  $t = 14.750$ ,  $P < 0.001$ )、Snail ( $0.46 \pm 0.01$  比  $0.76 \pm 0.02$ ;

$t = 29.640$ ,  $P < 0.001$  和  $0.46 \pm 0.01$  比  $0.86 \pm 0.00$ ;  $t = 70.700$ ,  $P < 0.001$ )、Slug ( $0.20 \pm 0.00$  比  $0.90 \pm 0.01$ ;  $t = 89.230$ ,  $P < 0.001$  和  $0.20 \pm 0.00$  比  $0.59 \pm 0.01$ ;  $t = 87.360$ ,  $P < 0.001$ ) 及转移标志物 MMP2 ( $0.19 \pm 0.00$  比  $0.56 \pm 0.01$ ;  $t = 84.540$ ,  $P < 0.001$  和  $0.19 \pm 0.00$  比  $0.46 \pm 0.01$ ;  $t = 67.120$ ,  $P < 0.001$ )、MMP9 ( $0.14 \pm 0.00$  比  $0.59 \pm 0.04$ ;  $t = 19.010$ ,  $P < 0.001$  和  $0.14 \pm 0.00$  比  $40.41 \pm 0.04$ ;  $t = 10.890$ ,  $P < 0.001$ ) 蛋白表达水平均明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组 (图 4A)。免疫荧光染色结果显示，与单药治疗组相比，联合治疗组上调 E-cadherin 的表达，下调 Vimentin 的

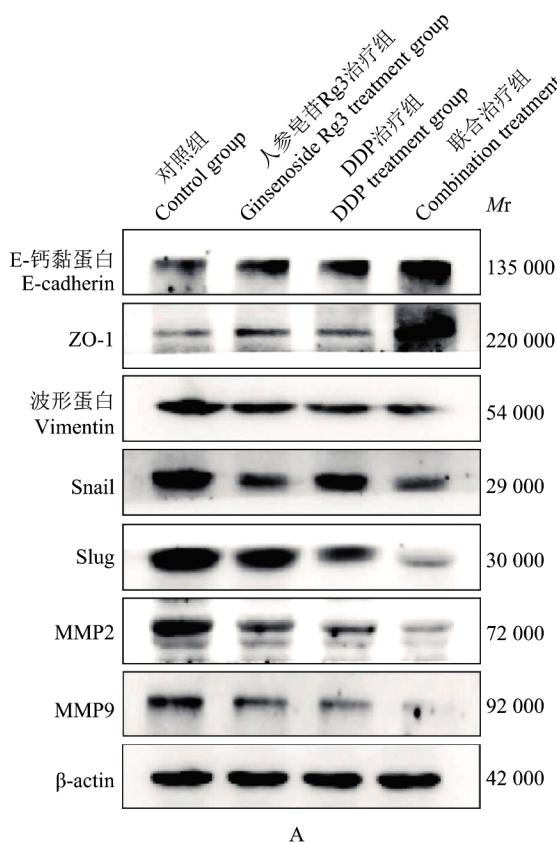
表达(图4B)。

**人参皂苷 Rg3 联合 DDP 抑制 Wnt/β-catenin 信号通路的激活** Western blot 检测结果显示, 人参皂苷 Rg3 和 DDP 联合治疗组的 Wnt ( $0.40 \pm 0.02$  比  $0.87 \pm 0.01$ ;  $t = 35.480$ ,  $P < 0.001$  和  $0.40 \pm 0.02$  比  $0.59 \pm 0.01$ ;  $t = 14.670$ ,  $P < 0.001$ )、β-catenin ( $0.36 \pm 0.00$  比  $0.56 \pm 0.00$ ;  $t = 155.800$ ,  $P < 0.001$  和  $0.36 \pm 0.00$  比  $0.90 \pm 0.01$ ;  $t = 118.100$ ,  $P < 0.001$ )、C-myc ( $0.32 \pm 0.02$  比  $0.56 \pm 0.01$ ;  $t = 20.870$ ,  $P < 0.001$  和  $0.32 \pm 0.02$  比  $0.36 \pm 0.01$ ;  $t = 3.334$ ,  $P = 0.029$ ) 和 Cyclin D1 ( $0.85 \pm 0.05$  比  $1.04 \pm 0.04$ ;  $t = 5.007$ ,  $P = 0.008$  和  $0.85 \pm 0.05$  比  $1.12 \pm 0.02$ ;  $t = 8.347$ ,  $P = 0.001$ ) 蛋白表达水平均明显低于人参皂苷 Rg3 治疗组和 DDP 治疗组(图5)。

## 讨 论

胃癌是全球发病率及死亡率分别位居第5位和第4位的恶性肿瘤, 手术治疗和放化疗是治疗胃癌的主要方法。对于没有淋巴结和远处转移且临床分期为T2以下的胃癌患者, 新辅助化疗是首选的治疗策略。DDP是胃癌化疗中的基础药物, 但胃癌治疗过程中产生的耐药性常导致治疗失败<sup>[12]</sup>。肿瘤细胞产生化疗药物耐药性的机制是药物在细胞内积累减少, 药物靶部位的有效浓度降低。因此, 迫切需要寻找可用于临床逆转耐药性的方法, 以提高患者的临床收益。

人参具有抗炎、抗癌和抗血管生成等作用, 人参皂



MMP: 基质金属蛋白酶

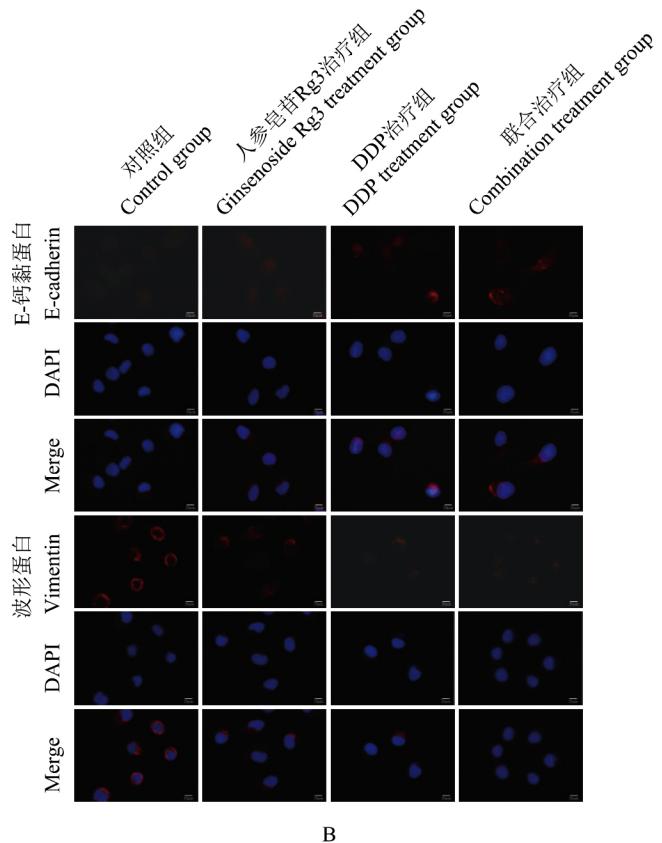
MMP: matrix metalloproteinase

A. Western blot 检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞中 E 钙黏蛋白、ZO-1、波形蛋白、Snail、Slug、MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平的影响; B. 免疫荧光染色检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞中 E 钙黏蛋白和波形蛋白表达水平的影响

A. Western blotting to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the expression levels of protein in E-cadherin, ZO-1, vimentin, Snail, Slug, MMP2, and MMP9 in SGC-7901/DDP cells; B. immunofluorescence staining assay to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the expression levels of E-cadherin and vimentin in SGC-7901/DDP cells

图4 人参皂苷 Rg3 联合 DDP 对 SGC-7901/DDP 细胞上皮-间充质转化进程的影响

Fig 4 Effect of ginsenoside Rg3 combined with DDP on epithelial-mesenchymal transformation process in SGC-7901/DDP cells



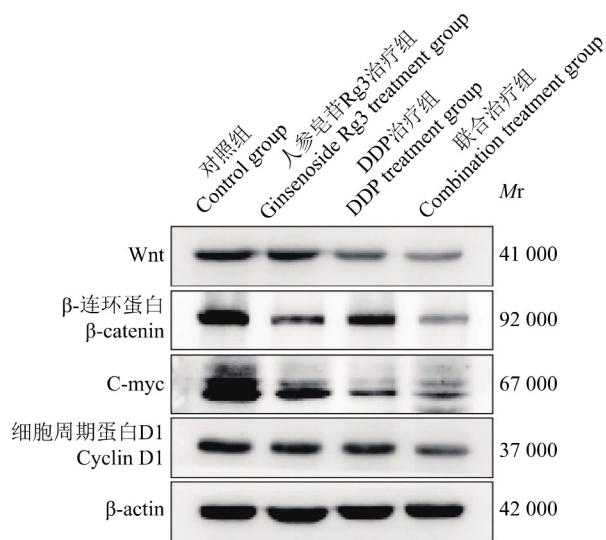


图 5 Western blot 检测人参皂苷 Rg3 与 DDP 单独或联合治疗对 SGC-7901/DDP 细胞中 Wnt、 $\beta$ -连环蛋白、C-myc 和细胞周期蛋白 D1 蛋白表达水平的影响

**Fig 5** Western blotting to detect the effects of ginsenoside Rg3 and DDP treatment alone or in combination on the expression levels of protein in Wnt,  $\beta$ -catenin, C-myc, and cyclin D1 in SGC-7901/DDP cells

昔 Rg3 是从人参中提取出来的主要活性成分之一<sup>[13]</sup>。研究表明，人参皂苷 Rg3 可增强 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂和紫杉醇等化疗药物在肿瘤治疗中的作用<sup>[14-16]</sup>。有文献报道人参皂苷 Rg3 通过下调程序性死亡配体-1 表达、抑制增殖并促进凋亡，从而减弱肺癌 DDP 耐药<sup>[17]</sup>。本研究结果显示，人参皂苷 Rg3 通过抑制 SGC-7901/DDP 细胞增殖并促进凋亡，增强胃癌对 DDP 的敏感性。

转移是一个复杂的过程，涉及部分肿瘤细胞的间质转化、微环境的重塑和转移细胞的定植等一系列变化。研究表明，人参皂苷 Rg3 增强吉非替尼在肺癌细胞中的抗转移能力<sup>[18]</sup>。EMT 是上皮细胞特征逐渐转化为间质细胞特征的一种胚胎学过程，被认为对体内局部侵袭和癌细胞扩散等过程至关重要<sup>[19]</sup>。研究发现，EMT 与肿瘤转移和不良预后密切相关，长链非编码 RNA H19 和血管内皮生长因子 C 通过促进 EMT 进程介导癌症转移，是多种癌症转移的必要过程<sup>[20-21]</sup>。人参皂苷 Rg3 通过下调结肠癌细胞中的 Notch-Hes1 信号通路抑制 EMT 进程<sup>[22]</sup>；通过阻断神经纤维网蛋白 1 介导的 EMT 进程从而抑制胃癌细胞增殖和迁移<sup>[23]</sup>；通过阻断核因子  $\kappa$ B 介导的 EMT 进程从而增强肺癌细胞对 DDP 的敏感性<sup>[24]</sup>。因此，下调肿瘤细胞 EMT 进程的相关蛋白表达有助于抑制胃癌转移并增强胃癌对化

疗药物的敏感性。本研究结果显示，人参皂苷 Rg3 与 DDP 联合治疗通过上调上皮标志物表达和下调间质标志物表达，从而抑制 SGC-7901/DDP 细胞迁移。

研究表明，人参皂苷 Rg3 通过阻断缺氧诱导因子 1 $\alpha$ /环氧合酶 2/人血管内皮生长因子信号通路抑制结肠癌细胞增殖、转移及新生血管的形成<sup>[25]</sup>；通过上调缺氧诱导因子 1 $\alpha$  靶向的 miR-519a-5p 抑制卵巢癌细胞的瓦博格效应<sup>[26]</sup>；通过增加 Rho GTPase 激活蛋白 9 的表达抑制肝癌细胞迁移和侵袭<sup>[27]</sup>。这些提示人参皂苷 Rg3 可通过靶向不同的通路或基因调控癌症细胞的增殖、凋亡、迁移和 EMT 进程。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活在肿瘤增殖、凋亡、迁移和耐药等过程中起着重要作用。研究表明，耐 DDP 的胃癌细胞株 SGC-7901/DDP 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路密切相关<sup>[28]</sup>。人参皂苷 Rg3 通过阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制胶质母细胞瘤和骨肉瘤的增殖、转移并促进细胞凋亡<sup>[29-30]</sup>。本研究结果显示，人参皂苷 Rg3 与 DDP 联合治疗显著抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的表达，从而增强胃癌对 DDP 的敏感性。

综上，本研究结果表明，人参皂苷 Rg3 联合 DDP 可抑制 SGC-7901/DDP 细胞的增殖、迁移和 EMT 进程，并促进细胞凋亡。同时，人参皂苷 Rg3 联合 DDP 可阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的相关蛋白表达水平，提示 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活在人参皂苷 Rg3 调控 SGC-7901/DDP 的耐药性中起重要作用，但具体作用机制亟待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] Macri A, Morabito F. The use of intraperitoneal chemotherapy for gastric malignancies [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2019, 19(10):879-888. DOI:10.1080/14737140.2019.1671189.
- [3] Mohanan P, Subramanyam S, Mathiyalagan R, et al. Molecular signaling of ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3 and their mode of actions [J]. J Ginseng Res, 2018, 42(2):123-132. DOI:10.1016/j.jgr.2017.01.008.
- [4] Liu Z, Liu T, Li W, et al. Insights into the antitumor mechanism of ginsenosides Rg3 [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(3):2639-2652. DOI:10.1007/s11033-021-06187-2.
- [5] Tan Q, Lin S, Zeng Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates the osimertinib resistance by reducing the stemness of non-small

- cell lung cancer cells [J]. Environ Toxicol, 2020, 35(6):643-651. DOI:10.1007/s11033-021-06187-2.
- [6] Liang Y, Zhang T, Jing S, et al. 20(S)-ginsenoside Rg3 inhibits its lung cancer cell proliferation by targeting EGFR-mediated Ras/Raf/MEK/ERK pathway [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(3):753-765. DOI:10.1142/S0192415X2150035X.
- [7] Kim H, Ji HW, Kim HW, et al. Ginsenoside Rg3 prevents oncogenic long noncoding RNA ATXN8OS from inhibiting tumor-suppressive microRNA-424-5p in breast cancer cells [J]. Biomolecules, 2021, 11(1):118. DOI:10.3390/biom11010118.
- [8] Pu Z, Ge F, Wang Y, et al. Ginsenoside-Rg3 inhibits the proliferation and invasion of hepatoma carcinoma cells via regulating long non-coding RNA HOX antisense intergenic [J]. Bioengineered, 2021, 12(1):2398-2409. DOI:10.1080/21655979.2021.1932211.
- [9] Zhao L, Sun W, Zheng A, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses ovarian cancer cell proliferation and invasion by inhibiting the expression of lncRNA H19 [J]. Acta Biochim Pol, 2021, 68(4):575-582. DOI:10.18388/abp.20205343.
- [10] Huang G, Liang M, Liu H, et al. CircRNA hsa\_circRNA\_104348 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulating miR-187-3p/RTKN2 axis and activating Wnt/beta-catenin pathway [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12):1065. DOI:10.1038/s41419-020-03276-1.
- [11] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1):165. DOI:10.1186/s13045-020-00990-3.
- [12] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance [J]. Oncogene, 2003, 22(47):7265-7279. DOI:10.1038/sj.onc.1206933.
- [13] Sun M, Ye Y, Xiao L, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 [J]. Int J Mol Med, 2017, 39(3):507-518. DOI:10.3892/ijmm.2017.2857.
- [14] Hong S, Cai W, Huang Z, et al. Ginsenoside Rg3 enhances the anticancer effect of 5FU in colon cancer cells via the PI3K/AKT pathway [J]. Oncol Rep, 2020, 44(4):1333-1342. DOI:10.3892/or.2020.7728.
- [15] Shan K, Wang Y, Hua H, et al. Ginsenoside Rg3 combined with oxaliplatin inhibits the proliferation and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via downregulating PCNA and cyclin D1 [J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(6):900-905. DOI:10.1248/bpb.b18-00852.
- [16] Yuan Z, Jiang H, Zhu X, et al. Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of paclitaxel through inhibiting NF-kappa B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:227-232. DOI:10.1016/j.biopha.2017.02.038.
- [17] Jiang Z, Yang Y, Yang Y, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates cisplatin resistance in lung cancer by downregulating PD-L1 and resuming immune [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96:378-383. DOI:10.1016/j.biopha.2017.09.129.
- [18] Dai Y, Wang W, Sun Q, et al. Ginsenoside Rg3 promotes the antitumor activity of gefitinib in lung cancer cell lines [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1):953-959. DOI:10.3892/etm.2018.7001.
- [19] Mitschke J, Burk UC, Reinheckel T. The role of proteases in epithelial-to-mesenchymal cell transitions in cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2019, 38(3):431-444. DOI:10.1007/s10555-019-09808-2.
- [20] Hu XT, Xing W, Zhao RS, et al. HDAC2 inhibits EMT-mediated cancer metastasis by downregulating the long noncoding RNA H19 in colorectal cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):270. DOI:10.1186/s13046-020-01783-9.
- [21] Kong D, Zhou H, Neelakantan D, et al. VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk [J]. Oncogene, 2021, 40(5):964-979. DOI:10.1038/s41388-020-01539-x.
- [22] Li X, Liu W, Geng C, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses epithelial-mesenchymal transition via downregulating Notch-Hes1 signaling in colon cancer cells [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(1):217-235. DOI:10.1142/S0192415X21500129.
- [23] Wu C, Zeng MH, Liao G, et al. Neuropilin-1 interacts with fibronectin-1 to promote epithelial-mesenchymal transition progress in gastric cancer [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:10677-10687. DOI:10.2147/OTT.S275327.
- [24] Wang J, Tian L, Khan MN, et al. Ginsenoside Rg3 sensitizes hypoxic lung cancer cells to cisplatin via blocking of NF-kappaB mediated epithelial-mesenchymal transition and stemness [J]. Cancer Lett, 2018, 415:73-85. DOI:10.1016/j.canlet.2017.11.037.
- [25] Tang YC, Zhang Y, Zhou J, et al. Ginsenoside Rg3 targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression *in vivo* [J]. Int J Oncol, 2018, 52(1):127-138. DOI:10.3892/ijo.2017.4183.
- [26] Lu J, Chen H, He F, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 upregulates HIF-1α-targeting miR-519a-5p to inhibit the Warburg effect in ovarian cancer cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(8):1455-1463. DOI:10.1111/1440-1681.13321.
- [27] Sun MY, Song YN, Zhang M, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits the migration and invasion of liver cancer cells by increasing the protein expression of ARHGAP9 [J]. Oncol Lett, 2019, 17(1):965-973. DOI:10.3892/ol.2018.9701.
- [28] Lian G, Li L, Shi Y, et al. BI2536, a potent and selective

- inhibitor of polo-like kinase 1, in combination with cisplatin exerts synergistic effects on gastric cancer cells [J]. Int J Oncol, 2018, 52(3):804-814. DOI:10.3892/ijo.2018.4255.
- [29] Ham SW, Kim JK, Jeon HY, et al. Korean Red ginseng extract inhibits glioblastoma propagation by blocking the Wnt signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 236: 393-400. DOI:10.1016/j.jep.2019.03.031.
- [30] Mao X, Jin Y, Feng T, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits the growth of osteosarcoma and attenuates metastasis through the Wnt/beta-Catenin and EMT signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:6065124. DOI:10.1155/2020/6065124.

(收稿日期: 2021-12-09)