

doi: 10.3969/j.issn.1002-7386.2020.09.001

· 论著 ·

# 人参皂苷 Rg3 联合沉默 MMP-9 抑制乳腺癌肿瘤细胞的生长和转移

廖天志 成宏

**【摘要】 目的** 研究人参皂苷 Rg3 联合沉默 MMP-9 基因对乳腺癌肿瘤生长和转移的作用,为探讨新的乳腺癌治疗方式和潜在靶点提供理论基础。**方法** 培养高转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231,使用 Rg3 处理细胞,并且转染 MMP-9 过表达载体或 MMP-9 siRNA 沉默载体。细胞划痕实验检测细胞迁移能力变化、采用 Transwell 小室使用检测细胞侵袭能力、CCK-8 检测细胞增殖活性、DNA 变化检测细胞周期。RT-qPCR 检测已处理并转染的 MDA-MB-231 中 MMP-9 表达变化,Western blot 检测细胞中 Ki-67、CDK1、VEGF、Twist1、MMP-9 蛋白的表达变化。**结果** Rg3 抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移能力,且下调 MMP-9 的 mRNA 及蛋白表达 ( $P < 0.05$ ),且 MMP-9 过表达显著逆转 Rg3 对细胞的侵袭和迁移能力的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。Rg3 联合沉默 MMP-9 处理细胞显著抑制高转移性乳腺癌细胞的增殖活性和 G1/S 周期进展以及 Ki-67 和 CDK1 蛋白的表达水平 ( $P < 0.05$ )。Rg3 联合沉默 MMP-9 处理细胞抑制该高转移性乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力以及 VEGF 和 Twist1 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** 人参皂苷 Rg3 通过抑制 MMP-9 抑制高转移性乳腺癌细胞的侵袭和迁移,人参皂苷 Rg3 联合沉默 MMP-9 抑制乳腺癌肿瘤细胞的生长,迁移及侵袭。

**【关键词】** 高转移性乳腺癌;人参皂苷 Rg3;基质金属蛋白酶 MMP-9;生长;迁移;侵袭

**【中图分类号】** R 737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-7386(2020)09-1285-06

**Effects of ginsenoside Rg3 and MMP-9 combined with the silencing of MMP-9 on the growth and metastasis of breast cancer in vitro** LIAO Tianzhi\*, CHENG Hong.\* Department of Oncology, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Hubei, Enshi 445000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rg3 and MMP-9 combined with the silencing of MMP-9 on the growth and metastasis of breast cancer in vitro, so as to provide theoretical basis for exploring new treatment methods and potential targets for breast cancer. **Methods** The high metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 was cultured in vitro, and the cells were treated with Rg3 and transfected with MMP-9 over-expression vectors or MMP-9 siRNA silencing vectors. The changes of cell migration ability were detected by cell wound healing test, and cell invasion ability was detected by Transwell chamber, cell proliferation activity was detected by CCK-8, and cell cycle was analyzed according to DNA changes. The expression levels of MMP-9 mRNA in the cells were detected by RT-qPCR. Moreover the expression levels of Ki-67, CDK1, VEGF, Twist1, and MMP-9 were detected by Western Blot. **Results** The Rg3 inhibited the invasion and migration of MDA-MB-231 cells and down-regulated the expression levels of MMP-9 mRNA and protein significantly ( $P < 0.05$ ). In addition MMP-9 over-expression significantly reversed the inhibition of Rg3 on cell invasion and migration ( $P < 0.05$ ). The Rg3 combined with MMP-9 silencing significantly inhibited the proliferation activity and G1/S cycle progression of the highly metastatic breast cancer cells, and inhibited the expression levels of Ki-67 and CDK1 ( $P < 0.05$ ). Furthermore, Rg3 combined with MMP-9 silencing cells inhibited the migration and invasion ability of the cells as well as the expression levels of VEGF and Twist1 proteins ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The ginsenoside Rg3 can inhibit the invasion and migration of high metastatic breast cancer cells by inhibiting MMP-9 expression. The ginsenoside Rg3 combined with silencing MMP-9 can inhibit the growth, migration and invasion of breast cancer cells.

**【Key words】** high metastatic breast cancer; ginsenoside Rg3; matrix metalloproteinase-9; growth; migration; invasion

乳腺癌是女性高危型恶性肿瘤之一,其发生率在女性肿瘤中居于首位<sup>[1]</sup>。另外,乳腺癌已经成为危害发达城市女性生命安全的第二大疾病,仅次于肺癌<sup>[2,3]</sup>。

临床手术、放化疗、内分泌治疗、分子靶向治疗等手段在治疗乳腺癌中均有较明显的缺陷<sup>[4]</sup>,因此,仍需积极探索乳腺癌发生发展机制,探寻更有效的抗癌药物和治疗方式。人参皂苷 Rg3 来源于名贵中药材人参,是一种已被多项研究确认具有明显抗肿瘤作用的人参活性单体成分,可抑制乳腺癌的增殖、迁移、耐药性,然而,越来越多研究发现 Rg3 可能和抗肿瘤西药结合使用具有良好的疗效<sup>[5-9]</sup>。另外,人参皂苷 Rg3 对于乳

作者单位: 445000 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院中西医结合肿瘤科(廖天志),乳腺外科(成宏)

通讯作者: 445000 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院乳腺外科;

E-mail: ld524593@163.com

腺癌侵袭能力的抑制作用和机制的研究笔者所见较少。基质金属蛋白酶(MMP)-9 可以调节包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤细胞的转移和组织血管生成<sup>[10-12]</sup>。而且,在甲状腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌中人参皂苷 Rg3 均可通过抑制 MMP-9 等表达活性对此类肿瘤的转移和恶性发展发挥抑制作用<sup>[13-15]</sup>。有研究发现,在乳腺癌细胞中人参皂苷 Rg3 可抑制 MMP-9 的分泌<sup>[16]</sup>。然而到目前为止,人参皂苷 Rg3 是否通过调节 MMP-9 在乳腺癌中介导恶性发展还不清楚。本研究使用 Rg3 刺激体外高转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231,拟验证 Rg3 对高转移性乳腺癌细胞同样具有抗迁移和侵袭的作用,通过高表达 MMP-9 的研究 Rg3 抑制乳腺癌侵袭作用的下游分子机制,探讨人参皂苷 Rg3 联合沉默 MMP-9 基因对乳腺癌肿瘤生长和转移的作用,报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 材料 高转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购买于 ATCC 美国模式培养物保藏所。人参皂苷 Rg3 购买于上海纯优生物科技, MMP-9 沉默载体 MMP-9 siRNA 的构建和 MMP-9 稳定低表达的 MDA-MB-231 细胞均购于上海吉玛公司, 10% 胎牛血清(fetal bovine Serum, FBS, 10099-141) 购买于美国 Gibco BRL 公司; Ki-67、CDK1、VEGF、Twist1、MMP-9、GAPDH 蛋白抗体均购于美国 Abcam 公司, 基质胶和 Transwell 小室购于美国 BD 公司。CCK-8 检测试剂盒购于美国 MCE 公司, DNA 含量检测细胞周期试剂盒购于美国 Solarbio 公司, 细胞凋亡检测试剂盒 Cell Death Detection ELISAPLUS 购于德国 Roche 公司。

1.2 细胞培养 MDA-MB-231 的培养使用 L-15 培养基(其中含 10% FBS)进行常规含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃ 培养箱培养。待形成细胞单层后使用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 传代比例 1:3, 并继续培养。供后续实验使用。

1.3 细胞转染和药物处理分组 细胞按照实验目的接种于合适的培养皿或者多孔板中进行处理, control 组: 无处理的 MDA-MB-231 细胞; Rg3 组: 单独 0.1 mmol/L 人参皂苷 Rg3 处理细胞; Rg3 + pcMMP-9: Rg3 和 MMP-9 过表达载体共处理组; Rg3 + pcMMP-9-NC: Rg3 和过表达空载体作为阴性对照组; Rg3 + siMMP-9: 人参皂苷 Rg3( Rg3, 0.1 mmol/L) 联合沉默 MMP-9; Rg3 + siNC: 人参皂苷 Rg3( Rg3, 0.1 mmol/L) 联合沉默 MMP-9 的阴性对照组。

1.4 细胞划痕实验 各处理组细胞收集至 48 孔板。培养细胞至融合率达到 80%, 换成无血清培养基培养

24 h。使用无菌 200  $\mu$ l 吸管尖端行培养板内侧底部划痕, 然后移除培养基, 换成新鲜无血清培养基。用配有数码相机的 Olympus IX70 显微镜进行拍照, 拍照时间为划痕后 0 h 及 24 h。利用 Image J 1.5 软件计算划痕两侧的距离, 测量划痕宽度变化。

1.5 Transwell 细胞侵袭实验 Transwell 侵袭实验按照供应商提供的实验步骤进行。上室底部铺 Matrigel 基质胶, 使用前进行基底膜水化。上室接种不同处理组的细胞(浓度为  $1 \times 10^6$  /ml) 0.5 ml。下室 0.6 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 再将小室放进培养板。培养 24 h 后, 在上层和下层的测试容器中分别加入 0.4% 的台盼蓝, 并进行风干, 使用结晶紫对膜进行染色, 在显微镜(200 $\times$ ) 视野下选取 5 个区域对细胞迁移数量直接进行计数统计。

1.6 RT-qPCR 对每组细胞入适量的 TRIzol 试剂, 严格按照说明书提取总 RNA, 采用反转录试剂盒将 5  $\mu$ g 总 RNA 反转录为 cDNA。然后用 SYBR Green 进行实时定量 PCR, 每组设置 3 个复孔, 反应条件设置为: 94℃ 5 min, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环。GAPDH 作为内参, 目的基因的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。

1.7 Western blot 用 PBS 清洗各组细胞 3 次, 加入细胞裂解液于 4℃ 反应 15 min, 4℃ 离心 12 000 r/min, 15 min。收集上清并测定各组样品的蛋白浓度。每个样品按照 20  $\mu$ g 的上样量, 于 SDS-PAGE 凝胶上分离蛋白, 转膜, 采用 3% 的脱脂牛奶于室温封闭 2 h, 4℃ 过夜孵育一抗, 孵育辣根过氧化物酶标记的二抗于室温反应 1.5 h。最后, ECL 发光显色, X 线胶片曝光, 采用 ImageJ 统计各条带灰度值。

1.8 CCK-8 实验 各组细胞转入 24 孔板于 37℃ 培养箱培养 24 h; 每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件培养 4 h; 酶标仪测定各孔吸光值 OD 450。细胞增殖活性率的计算: survival rate (%) = OD/OD<sub>0h</sub>  $\times$  100%。

1.9 细胞周期实验 通过 DNA 含量的检测对细胞周期进行分析。对各处理组的细胞进行收集, 随后对细胞进行碘化丙啶( Life Technologies) 染色, 使用 FACS Calibur Flow Cytometer ( BD Biosciences) 流式细胞仪确定细胞周期并对 G0/G1 和 S 期的细胞中 DNA 含量变化, 确定细胞周期并计算不同组间的差异。

1.10 统计学分析 应用 GraphPad Prism 5 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间采用  $t$  检验, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 随后进行 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 Rg3 抑制高转移性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移和侵袭及 MMP-9 的表达 与 control 组比较, Rg3 组 MDA-MB-231 细胞的迁移率下调, 差异有统计学意义

( $P < 0.05$ ), 且 Rg3 组细胞的侵袭率亦下调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 control 组比较, MMP-9 的 mRNA 水平和蛋白水平均下调, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1, 图 1。

表 1 Rg3 抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭及 MMP-9 的表达

$n = 3, \bar{x} \pm s$

组别	细胞迁移率(%)	细胞侵袭率(%)	MMP-9 mRNA 水平相对表达量	MMP-9 蛋白水平相对表达量
Control 组	72.49 ± 3.77	28.86 ± 1.18	0.94 ± 0.16	0.88 ± 0.09
Rg3 组	48.11 ± 2.32*	17.68 ± 2.51*	0.56 ± 0.09*	0.38 ± 0.13*

注: 与 Control 组比较, \*  $P < 0.05$

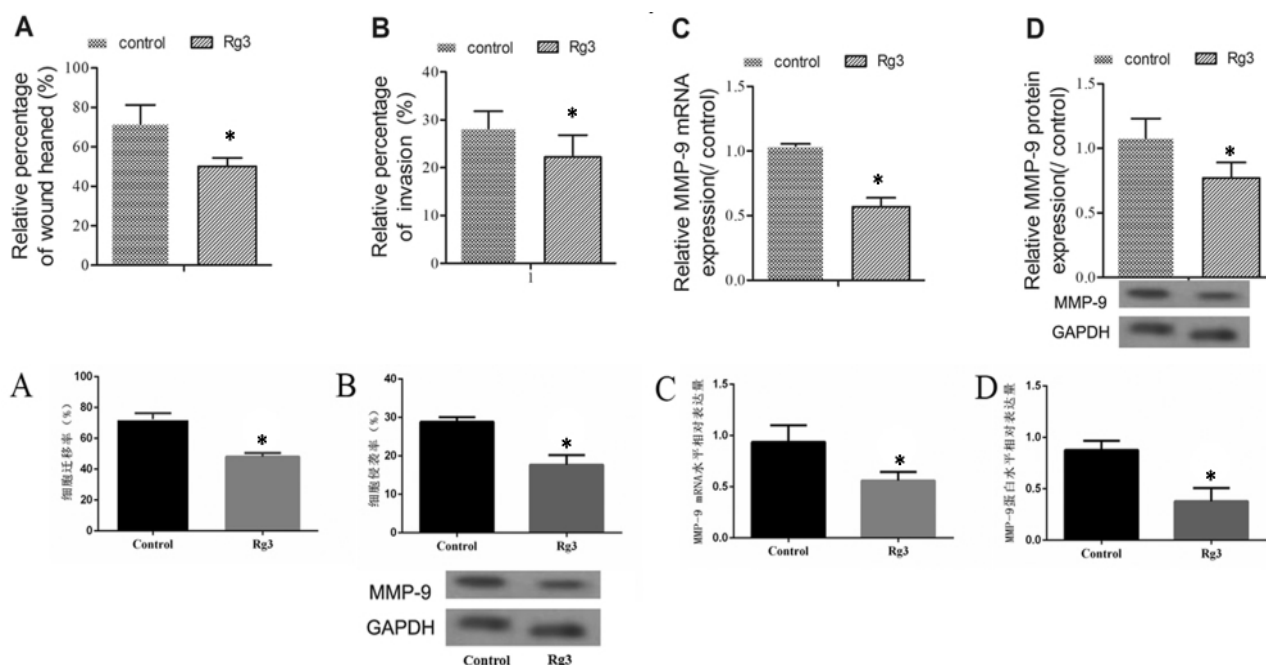


图 1 Rg3 抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭及 MMP-9 的表达; A 细胞伤口愈合实验检测细胞迁移率的变化; B Transwell 实验检测细胞侵袭率; MMP-9 相对 mRNA (C) 和蛋白 (D) 的表达变化

2.2 Rg3 通过抑制 MMP-9 的表达负调控高转移性乳腺癌细胞的迁移和侵袭 与单独 Rg3 处理相比, Rg3 + pc-MMP-9 组的 MDA-MB-231 细胞的迁移率部分上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且 Rg3 组细胞的侵袭率同样增加, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与

control 组相比, Rg3 处理后 VEGF 和 Twst1 的蛋白水平都下调( $P < 0.05$ ), 与单独 Rg3 处理相比, VEGF 和 Twst1 的蛋白水平部分恢复, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Rg3 下调 MMP-9 是其抗乳腺癌细胞的迁移和侵袭的关键机制之一。见表 2, 图 2。

表 2 Rg3 联合 MMP-9 过表达调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭

$\bar{x} \pm s$

组别	MMP-9 蛋白水平相对表达量	细胞迁移率(%)	细胞侵袭率(%)	VEGF 蛋白水平相对表达量	Twst1 蛋白水平相对表达量
Control 组	0.25 ± 0.09	73.08 ± 2.61	26.75 ± 2.64	0.85 ± 0.06	0.83 ± 0.08
pc-NC 组	0.24 ± 0.08				
pc-MMP-9 组	0.88 ± 0.10				
Rg3 组		49.67 ± 3.43	19.56 ± 1.92	0.22 ± 0.07	0.23 ± 0.07
pc-MMP-9 + Rg3 组		59.40 ± 2.43	23.19 ± 3.07	0.34 ± 0.05	0.31 ± 0.02
pc-NC + Rg3 组		49.99 ± 6.88	20.42 ± 2.06	0.24 ± 0.05	0.23 ± 0.09
* P vs. control 组	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
# P vs. Rg3 组		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

2.3 Rg3 联合沉默 MMP-9 抑制高转移性乳腺癌细胞的增殖活性和 G1/S 周期进展 CCK-8 结果发现, 与单独 Rg3 处理组相比, Rg3 处理和 MMP-9 沉默联合处理抑制乳腺癌细胞的增殖活性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且 Ki-67 蛋白的表达在联合处理组中下调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。其次, G1/S 期进

展研究结果发现, 与单独 Rg3 处理组相比, Rg3 处理和 MMP-9 沉默联合处理可抑制 G1 期细胞向 S 进展, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。且细胞周期依赖性蛋白 CDK1 的表达水平被下调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Rg3 联合 MMP-9 沉默可明显抑制高转移性乳腺癌细胞的增殖活性和 G1/S 周期进展。见表 3, 图 3。

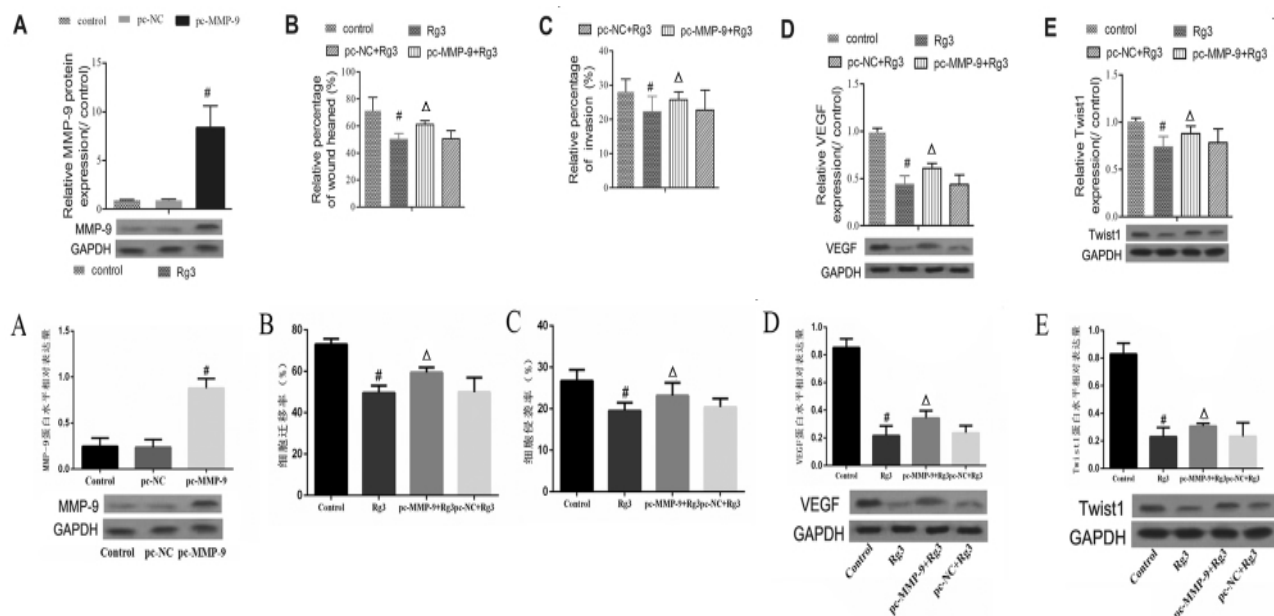


图 2 Rg3 联合 MMP-9 过表达调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭: A MMP-9 蛋白相对表达变化: \*  $P < 0.05$  vs. control 组,  $n = 3$ ; B 细胞迁移率的变化; C Transwell 实验检测细胞侵袭率变化; VEGF (D) 和 Twist1 (E) 蛋白表达变化, #  $P < 0.05$  vs. control 组,  $\Delta P < 0.05$  vs. Rg3 组, Rg3: 人参皂苷 Rg3; pc-MMP-9: MMP-9 蛋白的真核表达载体 pcDNA3.1 (+) -MMP-9; pc-NC: pcDNA3.1 (+) 空载体作为阴性对照

表 3 Rg3 联合沉默 MMP-9 调节乳腺癌细胞的增殖和细胞周期进展

组别	6 h	12 h	24 h	48 h	G1 期	S 期	KI-67 蛋白水平相对表达量	CDK1 蛋白水平相对表达量
Control 组	0.84 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.73 ± 0.10	0.75 ± 0.10	52.69 ± 6.17	51.99 ± 5.24	0.86 ± 0.07	0.83 ± 0.09
si-NC 组	0.82 ± 0.06	0.77 ± 0.05	0.74 ± 0.08	0.69 ± 0.09	52.78 ± 3.92	52.21 ± 3.64	0.85 ± 0.06	0.83 ± 0.06
si-MMP-9 组	0.74 ± 0.06	0.74 ± 0.05	0.71 ± 0.08	0.66 ± 0.07	62.79 ± 4.93	42.83 ± 8.49	0.42 ± 0.09	0.46 ± 0.06
si-MMP-9 + Rg3 组	0.61 ± 0.07	0.58 ± 0.10	0.44 ± 0.11	0.40 ± 0.05	79.50 ± 7.94	38.77 ± 1.58	0.27 ± 0.06	0.32 ± 0.07
si-NC + Rg3 组	0.67 ± 0.09	0.64 ± 0.12	0.57 ± 0.13	0.55 ± 0.08	71.11 ± 7.59	46.21 ± 4.56	0.35 ± 0.06	0.41 ± 0.10
Rg3 组	0.76 ± 0.03	0.68 ± 0.09	0.66 ± 0.11	0.63 ± 0.05	71.11 ± 7.68	46.27 ± 6.96	0.34 ± 0.09	0.41 ± 0.08
* $P$ vs. control 组					< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
# $P$ vs. si-MMP-9 组					< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
$\Delta P$ vs. si-MMP-9 + Rg3 组	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

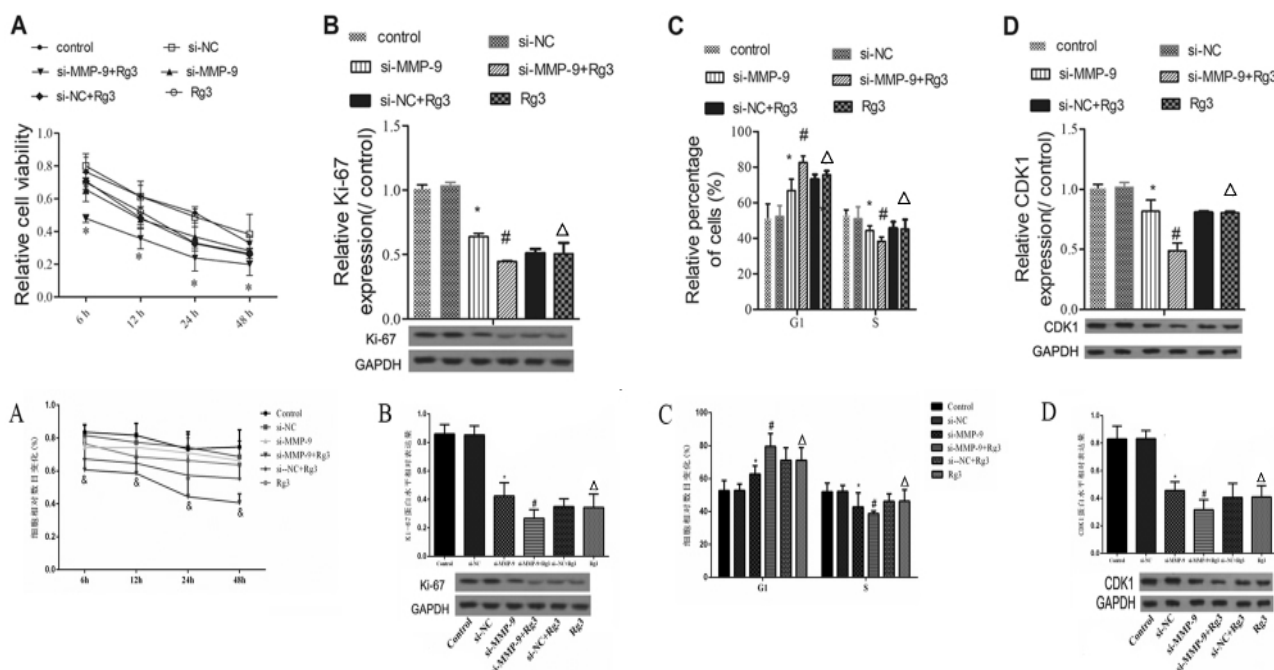


图 3 Rg3 联合 MMP-9 沉默调节乳腺癌细胞的增殖和细胞周期进程: A CCK-8 检测细胞的增殖活性; #  $P < 0.05$  vs. control 组,  $n = 3$ ; B Ki-67 蛋白水平变化; C G1 期细胞和 S 期细胞相对数目变化; (D) CDK1 蛋白水平变化, \*  $P < 0.05$  vs. control 组, #  $P < 0.05$  vs. si-MMP-9 组,  $\Delta P < 0.05$  vs. si-MMP-9 + Rg3 组, Rg3: 人参皂苷 Rg3; si-MMP-9: MMP-9 siRNA 沉默载体; si-NC: siRNA 阴性对照

2.4 Rg3 联合沉默 MMP-9 抑制高转移性乳腺癌细胞的迁移和侵袭 细胞划痕实验发现,与单独 Rg3 处理组相比,Rg3 处理和 MMP-9 沉默联合处理可抑制乳腺癌细胞的划痕愈合能力,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),Transwell 细胞侵袭实验发现,与单独 Rg3 处理相比,

Rg3 处理和 MMP-9 沉默联合处理可以抑制细胞的侵袭率,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。且 VEGF 和 Twist1 的蛋白的表达水平均被下调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。因此,Rg3 联合 MMP-9 沉默可明显抑制高转移性乳腺癌细胞的迁移和侵袭。见表 4,图 4。

表 4 Rg3 联合 MMP-9 沉默调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭

组别	细胞迁移率(%)	细胞侵袭率(%)	VEGF 蛋白水平相对表达量	Twist1 蛋白水平相对表达量
Control 组	74.27 ± 4.29	27.36 ± 2.17	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.08
si-NC 组	74.73 ± 6.61	27.33 ± 2.95	0.89 ± 0.12	0.93 ± 0.14
si-MMP-9 组	55.08 ± 7.26	19.99 ± 2.90	0.34 ± 0.06	0.33 ± 0.09
si-MMP-9 + Rg3 组	37.72 ± 5.11	14.69 ± 4.39	0.27 ± 0.12	0.25 ± 0.09
si-NC + Rg3 组	51.49 ± 4.45	22.94 ± 4.10	0.36 ± 0.09	0.38 ± 0.08
Rg3 组	51.28 ± 3.48	22.78 ± 5.33	0.36 ± 0.08	0.38 ± 0.09
* P vs. control 组	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
* P vs. si-MMP-9 组	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
△ P vs si-MMP-9 + Rg3 组	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

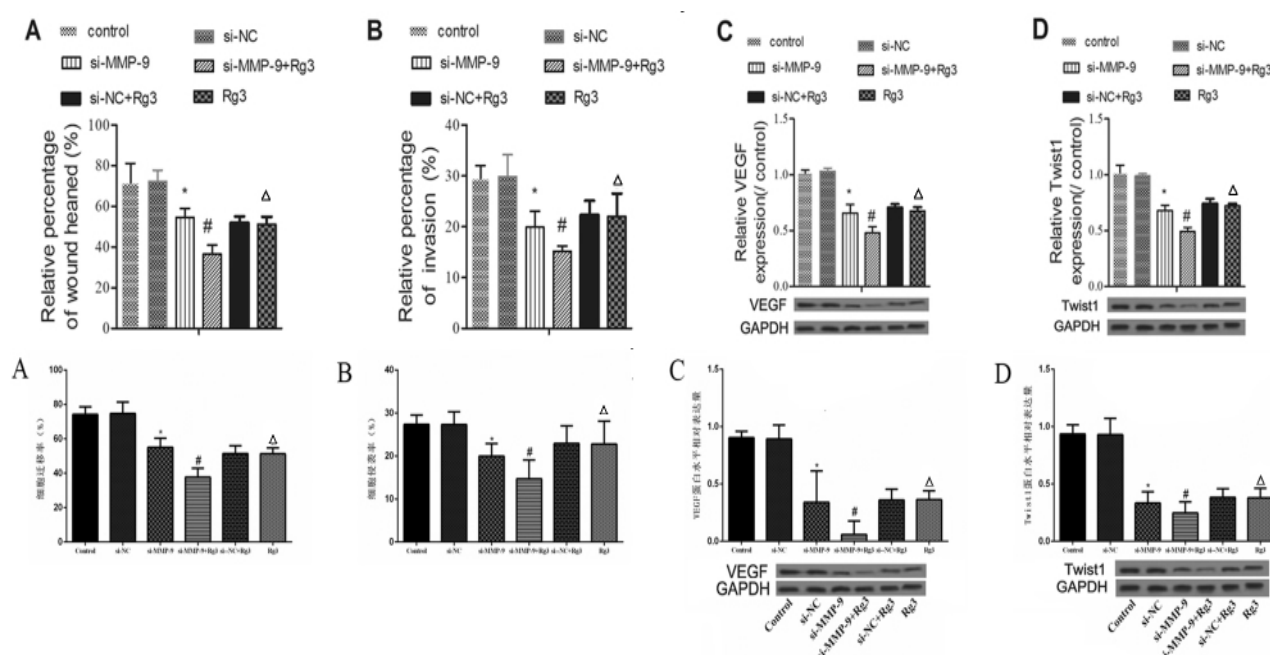


图 4 Rg3 联合 MMP-9 沉默调节乳腺癌细胞的迁移和侵袭; A 伤口愈合实验检测细胞迁移率的变化; B Transwell 实验检测细胞侵袭率变化; VEGF (C) 和 Twist1 (D) 蛋白表达变化; # $P < 0.05$  vs. control 组, \* $P < 0.05$  vs. control 组, # $P < 0.05$  vs. si-MMP-9 组, △ $P < 0.05$  vs. si-MMP-9 + Rg3 组, Rg3: 人皂苷 Rg3; si-MMP-9: MMP-9 siRNA 沉默载体; si-NC: siRNA 阴性对照

### 3 讨论

MDA-MB-231 细胞是一种恶性程度较高的人乳腺癌细胞,具有高转移性和高增殖活性<sup>[17]</sup>。人参皂苷 Rg3 可抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖活性并抑制凋亡,其中就包括乳腺癌细胞 MDA-MB-231<sup>[5,18]</sup>。而且最新研究发现人参皂苷 Rg3 可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力<sup>[18]</sup>。然而,到目前为止 Rg3 对于乳腺癌细胞的侵袭能力的影响并不明确。本研究结果发现, Rg3 不仅抑制 MDA-MB-231 细胞的划痕愈合能力,而且可抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。因此, Rg3 不仅明显抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖和迁移,而且对 MDA-MB-231 的侵袭性同样具有明显的抑制作用。表明人参皂苷 Rg3 是一种潜在的抗恶性乳腺癌细胞

侵袭的药物。

MMPs 介导基膜和细胞外基质降解和细胞迁移等过程<sup>[19]</sup>。而且, MMP9 是最关键的肿瘤分泌 MMPs 之一,在基膜Ⅵ胶原和其他基质蛋白的降解过程中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。有研究表明 Rg3 在抑制黑素瘤细胞的肺转移过程中,同样抑制了 MMP-9 的表达<sup>[21]</sup>,同样的结果在结肠癌细胞 HT-29 中被验证<sup>[22]</sup>。本研究发现 Rg3 同样可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的 MMP-9 的 mRNA 和蛋白水平的表达。更重要的是,本研究发现过表达 MMP-9 明显逆转 Rg3 对该乳腺癌细胞侵袭作用的抑制效果。因此表明 Rg3 可通过下调 MMP-9 的表达抑制高转移性乳腺癌细胞的侵袭能力。

中药联合基因治疗是中西医结合的治疗方法之

一,已被运用于许多病症的基础与临床研究。在治疗肺癌恶性胸水的研究中,王维等使用攻癌利水散的外敷并联合重组的 p53 基因腺病毒胸腔灌注进行治疗<sup>[23]</sup>。对原发性肝癌的中西医治疗也得到良好的治疗效果<sup>[24]</sup>。更重要的是,研究发现沉默 MMP-9 可以抑制多种肿瘤细胞的生长,包括胃癌细胞<sup>[25]</sup>、白血病单核细胞<sup>[26]</sup>、黑色素瘤细胞等<sup>[27]</sup>。本研究同样发现单独沉默 MMP-9 对乳腺癌细胞的增殖和细胞周期进程具有明显的抑制作用,而且沉默 MMP-9 联合 Rg3 处理对高侵袭性乳腺癌细胞的增殖活性和细胞的周期进展的抑制效果均高于单独沉默 MMP-9。肿瘤的中西医结合治疗方式在多种报道中已经表明,其效果均优于单独治疗。重组人血管内皮抑制素联合 Rg3 处理乳腺癌细胞可以抑制乳腺癌肿瘤小鼠的瘤生长,这种抑制效果明显优于单独 Rg3 或单独使用重组人血管内皮抑制素处理<sup>[28]</sup>。另外,Rg3 和多种抗肿瘤西药联合使用对多种肿瘤细胞的生长和血管生成均具有较好的抑制效果<sup>[29,30]</sup>。而且,研究发现 MMP-9 沉默抑制多种癌细胞的侵袭和迁移<sup>[31]</sup>。而本研究结果同样发现,Rg3 联合 MMP-9 基因沉默对细胞侵袭和迁移具有更明显的抑制作用。另外,相比单独沉默 MMP-9, siRNA 联合沉默 MMP-9 和 FAK 基因可以明显抑制高转移性小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 的侵袭和迁移<sup>[27]</sup>。

综上所述,中药单体 Rg3 联合 MMP-9 敲减可能是西医结合治疗乳腺癌的有效方法之一。仍需进一步在体内实验进行反复验证,为乳腺癌等多种肿瘤治疗方法提供新的思路。

### 参考文献

- 1 陈万青,郑荣寿.中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况.中国肿瘤临床,2015,42:668-674.
- 2 钱桂生,余时沧.肺癌流行病学最新资料与启示.中华结核和呼吸杂志,2012,31:86-89.
- 3 汪登斌.乳腺 MRI 应用现状和我国乳腺 MRI 应用中存在的问题.中华放射学杂志,2014,35:177-179.
- 4 姚月歌,姚楨.乳腺癌的分子靶向治疗.日本医学介绍,2007,28:177-179.
- 5 孙大鹏,顾立学,李晨光,等.人参皂苷 Rg3 通过人乳腺珠蛋白 A 促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡及其可能的机制.中国肿瘤生物治疗杂志,2017,24:615-619.
- 6 潘晓华,王墨林,崔行.人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞增殖的影响及其机制探讨.山东医药,2011,51:20-22.
- 7 Zhang Q, Kang X, Yang B, et al. Antiangiogenic effect of capecitabine combined with ginsenoside Rg3 on breast cancer in mice. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2008, 23: 647-654.
- 8 Chen X, Qian L, Jiang H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits CXCR 4 expression and related migrations in a breast cancer cell line. International journal of clinical oncology, 2011, 16: 519-523.
- 9 陈云,张立,俞勇,等.人参皂苷 Rg3 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和侵袭的影响.中国现代应用药学,2013,30:722-725.
- 10 王丽辉,刘大渔,吕申.乳腺癌细胞促血管生成能力及 MMP-9 表达与其淋巴道转移的关系.肿瘤防治研究,2005,32:1-5.
- 11 沈国满.重组人血管内皮抑制素注射液对老年转移性乳腺癌患者疗效及对血清血管内皮细胞生长因子和基质金属蛋白酶-9 的影响.中国老年学杂志,2012,19:4274-4275.
- 12 Mink W, Kimd H, Dos I, et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and-9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. Apmis, 2014, 122: 1196-1206.
- 13 Junmin S, Hongxiang L, Zhen L, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colon cancer cell migration by suppressing nuclear factor kappa B activity. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 35: 440-444.
- 14 Wang L, Li X, Song YM, et al. Ginsenoside Rg3 sensitizes human non-small cell lung cancer cells to  $\gamma$ -radiation by targeting the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. Molecular medicine reports, 2015, 12: 609-614.
- 15 Tian-min XU, Cui MH, Ying X, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 on ovarian cancer metastasis. Chinese Medical Journal, 2008, 121: 1394-1397.
- 16 李博,杨威,郑永晨,等.人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞表达 MMP-2 和 MMP-9 的影响.中国老年学,2005,25:953-954.
- 17 Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, et al. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. Cancer Research, 2007, 67: 4182-4189.
- 18 郭琪,袁明慧,郭宇飞.人参皂苷 Rg3 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和侵袭的影响.实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5:8-10.
- 19 Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2001, 21: 1104-1117.
- 20 邢丽丽. MMP9 和 COX2 基因多态性与结直肠癌易感性的关联研究.中国医科大学,2008.
- 21 姜新,辛颖,许天敏,等.人参皂苷 Rg3 对小鼠 B16 黑色素瘤细胞侵袭、转移及 MMP-9 表达的影响.肿瘤,2011,31:117-121.
- 22 杜卫东,屠巍巍,孙传.人参皂苷 Rg3 对 HT-29 细胞株 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响.中国中西医结合外科杂志,2012,18:154-157.
- 23 陈红,王维,李枋霏,等.攻癌利水散外敷联合重组 p53 基因腺病毒治疗肺癌胸水 30 例.西部中医药,2017,30:106-108.
- 24 史守良,崔守章,胡万宁,等. P53 基因治疗药联合中药治疗原发性肝癌的疗效观察.现代中西医结合杂志,2012,21:693-694.
- 25 林洪坦. MMP-9 基因沉默抑制胃癌裸鼠移植瘤生长的实验研究.福建医科大学,2011.
- 26 禹莉,凌云志,肖霄,等. RNA 干扰技术沉默 MMP-9 基因对 THP-1 细胞影响的实验研究.中国免疫学杂志,2014,37:1069-1073.
- 27 汤禾静,唐照勇,刘隆兴,等. siRNA 联合沉默 MMP-9 和 FAK 基因对小鼠黑色素瘤高转移细胞 B16F10 体外侵袭和迁移的影响.中国生物工程杂志,2014,34:40-47.
- 28 Zhang Y, Liu QZ, Xing SP, et al. Inhibiting effect of Endostar combined with ginsenoside Rg3 on breast cancer tumor growth in tumor-bearing mice. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016, 9: 180-183.
- 29 Kim SM, Lee SY, Cho JS, et al. Combination of ginsenoside Rg3 with docetaxel enhances the susceptibility of prostate cancer cells via inhibition of NF- $\kappa$ B. European Journal of Pharmacology, 2010, 631: 1-9.
- 30 Xu TM, Xin Y, Cui MH, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. Chin Med J, 2007, 120: 584-588.
- 31 刘丹,陈国福,刘永庆,等. RNA 干扰基质金属蛋白酶-9 对骨肉瘤 MG-63 细胞侵袭、迁移的影响.中国老年学杂志,2018,38:4027-4030.

(收稿日期:2019-10-12)