

· 论 著 ·

人参皂苷 Rd 抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞的生长及作用机制

210002 南京 东部战区总医院秦淮医疗区肿瘤内科

朱春燕, 马爱珍¹, 黄 勇, 龚新雷, 叶丽红^{2,3}

【摘 要】 目的 探讨人参皂苷 Rd(GS-Rd)对人非小细胞肺癌(NSCLC)细胞株 A549 细胞增殖、凋亡、侵袭和周期的影响及可能机制。**方法** 采用 MTT 法,观察不同浓度(12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)GS-Rd 体外作用 NSCLC 细胞系 A549 不同时间后对其细胞活力的影响;利用高内涵分析软件,观察不同浓度、不同时间作用于 A549 细胞系的荧光强度以评估其对细胞凋亡的影响;采用 Transwell 法观察不同浓度 GS-Rd 对 A549 细胞侵袭能力的影响;利用流式细胞仪检测 A549 细胞周期的阻滞效应;Western blotting 检测经 GS-Rd 处理后 A549 细胞周期相关蛋白的表达情况。**结果** MTT 法结果显示,12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ GS-Rd 处理 A549 细胞后的 24 h 增殖抑制率分别为 3.54%、18.25%、26.58% 和 32.38%,48 h 增殖抑制率分别为 21.91%、27.15%、40.37% 和 46.44%。随着药物浓度的增加,其增殖抑制率也随之增加,呈剂量-时间依赖性($P<0.05$)。高内涵分析显示,GS-Rd 对细胞亦具有明显的促凋亡作用,且呈剂量-时间依赖性。Transwell 小室结果显示,12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ GS-Rd 作用 A549 细胞后的穿膜细胞数分别为 (78.2 ± 16.32) 个、 (57.0 ± 10.37) 个和 (42.8 ± 15.98) 个,空白组为 (89.8 ± 12.87) 个。与空白组比较,GS-Rd 组的细胞侵袭数目明显减少,并呈浓度依赖性($P<0.05$)。流式细胞仪检测结果显示,与空白组比较,GS-Rd 作用 A549 细胞 24 h 后,出现 G_0/G_1 期细胞比例逐渐上升,而 S 期细胞比例逐渐下降,细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。Western blotting 检测结果显示,磷酸化 Akt 表达下降,且 p21、p27 表达上升。**结论** GS-Rd 可直接抑制 NSCLC 细胞系 A549 的增殖,亦可通过阻滞细胞周期于 G_1 期抑制细胞增殖,且降低了 A549 细胞系的侵袭能力。

【关键词】 非小细胞肺癌; 人参皂苷 Rd; A549 细胞; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞周期

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2022)01-0001-07

Inhibitory effect of ginsenoside Rd on the growth of non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanism

ZHU Chunyan, MA Aizhen, HUANG Yong, GONG Xinlei, YE Lihong. Department of Medical Oncology, Qinhuai Medical District, Eastern Theater General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: YE Lihong, E-mail: cocolihongye@126.com

【Abstract】 Objective To explore the cell proliferation, apoptosis, invasion and the cell cycle of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549 which was treated by ginsenoside Rd (GS-Rd) *in vitro*. **Methods** MTT method was used to observe the effect of GS-Rd on the cell viability of NSCLC cell line A549 *in vitro*. High content analysis software was used to observe the fluorescence intensity of A549 cell line at different concentrations and times to evaluate the apoptosis of A549 cells. Transwell invasion assay was used to observe the invasion capability. Flow cytometry method was used to observe the cell cycle induced by different concentrations of GS-Rd in A549 cells. Western blotting was used to detect the expression of A549 cycle-related proteins after GS-Rd treatment. **Results** MTT assay showed that the 24 h proliferation inhibition rates of A549 cells treated with 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ GS-Rd were 3.54%, 18.25%, 26.58% and 32.38% respectively, and the 48 h proliferation inhibition rates were 21.91%, 27.15%, 40.37% and 46.44% respectively. The inhibition effect also increased with increasing concentration in a dose-to time-dependent manner ($P<0.05$). The high content analysis showed that GS-Rd also had significant pro-apoptotic effect on cells, presenting time-effect and dose-effect relationship. The number of membrane cells of 12.5, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ GS-Rd was 78.2 ± 16.32 , 57.0 ± 10.37 and 42.8 ± 15.98 respectively, which lower than 89.8 ± 12.87 of the blank group ($P<0.05$). Compared with the blank

1 212000 七里甸社区卫生服务中心

2 210004 南京中医药大学附属医院普内科

3 通讯作者, E-mail: cocolihongye@126.com

group, the invasion rate of GS-Rd decreased significantly in a concentration dependent manner ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that compared with the blank group, the proportion of cells in G_0/G_1 phase gradually increased after GS-Rd treated A549 cells for 24 hours, while the proportion of cells in S phase gradually decreased, and the cell cycle was arrested at G_0/G_1 phase. Western blotting showed that the expression of phosphorylated AKT decreased and p21, p27 expression increased. **Conclusion** GS-Rd can directly inhibit the proliferation of the NSCLC cell line A549, and it can also inhibit the cell proliferation by blocking the cell cycle in the G_1 phase. In addition, the invasive capacity of the A549 cell line could also be reduced.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer; Ginsenoside Rd; A549 cell line; Cell proliferation; Cell invasion; Cell cycle

根据 GLOBOCAN 2020 年国际癌症研究机构提供的癌症发病率和死亡率估计数据,到 2020 年,全球估计有 1930 万例新癌症病例和近 1000 万例癌症死亡。肺癌仍然是导致癌症死亡的主要原因,估计有 180 万人死亡,占总癌症死亡的 18%^[1]。而在中国,据统计 2017 年肺癌为死亡的第 3 位原因^[2]。非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌发病总数的 80%~85%,因缺乏早期有效的诊断与筛查,所以患者确诊时 80% 已是晚期,失去了手术根治的机会,5 年总生存率低于 5%^[3]。所以探讨肺癌发生及发展的分子机制,对肺癌的诊治和改善预后至关重要。

如今越来越多的中药制剂在肿瘤治疗中得到关注并证实发挥作用。人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd, GS-Rd) 属达玛烷型人参皂苷中的二醇型,分子式为 $C_{48}H_{82}O_{18}$,相对分子质量为 947.12。肿瘤防治现已成为世界性难题,而 Rd 作为天然、低毒的抗肿瘤药物,亦受到广泛关注。对于 GS-Rd 的药效作用研究已非常深入,主要有抗疲劳、延缓衰老、调节中枢神经系统、抑制肿瘤细胞生长、提高机体免疫力及改善心脑血管等作用^[4-6]。在抗肿瘤方面,GS-Rd 可诱导黑色素瘤、结直肠癌、胃癌、宫颈癌等多种肿瘤细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞增殖,进而达到抗肿瘤作用,而对 NSCLC 细胞的作用尚不清楚。本研究旨在探讨 GS-Rd 对肺腺癌 A549 细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 人肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所,DMEM/F12 细胞培养基、DMEM 高糖培养基、新生胎牛血清购自美国 Gibco 公司,GS-Rd 购自南京泽朗医药科技有限公司,胰蛋白酶粉购自 Bio-sharp 公司,PBS 粉、MTT 粉剂、二甲基亚砜 (DMSO) 分析纯、

PI 染液、Hoechst 33258、硝酸纤维素膜均购自美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司,Transwell 小室 (有基质胶) 购自美国 Corning 公司,细胞周期试剂盒购自凯基生物技术有限公司。30% Acr-Bis、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司,各种蛋白抗体购自 Cell Signaling Technology。

1.2 细胞培养及分组 A549 细胞生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,待细胞生长至 70%~80% 融合率后进行传代和用于实验。以含不同浓度 GS-Rd 为实验组,含有顺铂 (DDP) 的为阳性对照组,另设空白对照组。

1.3 MTT 细胞增殖检测 采用 MTT 法检测细胞活力,调整细胞浓度为 5×10^4 /ml,接种于无菌的 96 孔培养板中。每孔加入肿瘤细胞悬液 200 μ l,培养 24 h 后弃掉培养液,实验组分别加入含不同浓度 (12.5、25、50、100 μ mol/L) GS-Rd 的完全培养液 200 μ l,另设空白对照孔加等量的细胞悬液,阳性对照组培养液中含有 DDP,终浓度为 4 μ g/ml,每组均为 3 个复孔。于 37℃、5% CO_2 培养箱中继续培养 24、48 h。每孔各吸出 200 μ l 培养液后,各加入 20 μ l MTT 溶液,继续培养 4 h,弃去全部上清,每孔加入 150 μ l DMSO 终止反应。利用酶联免疫检测仪测定波长 490 nm 处各孔吸光值 (A) 来判断和比较细胞增殖情况,实验重复 3 次。增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.4 高内涵分析 取对数生长期的单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,将细胞接种于 96 孔板,每孔 0.1 ml,24 h 后换液,实验组加入含不同浓度 (12.5、25、50 μ mol/L) GS-Rd 的完全培养液,继续培养 24、48 h。消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,重悬于 Binding Buffer 中,加入 Annexin V-FITC、溴化乙锭 (PI)、Hoechst 33258 染液各 3 μ l,室温避光染色 30

min,用高内涵细胞成像分析(high content analysis, HCA)系统分析图像。

1.5 细胞侵袭实验 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12、DMEM 高糖培养液培养 A549 细胞,待细胞长势良好情况下,用不含血清的培养液悬浮细胞,取 200 μ l 细胞悬液接种于 8 μ m 的 Transwell 小室聚碳酸酯膜上,置于 24 孔板中,调整细胞密度至 10^5 ,并加入含不同浓度(12.5、25、50 μ mol/L) GS-Rd 的无血清培养液,下室加入 10% 的完全培养液 500 μ l,常规培养细胞 8 h。取出 Transwell 小室,弃去上室液体,用棉签擦去上室未穿过的细胞及基质胶,下室面用甲醇固定 10 min,瑞氏-吉姆萨混合染液染色,并在光学显微镜 400 倍下计数穿膜细胞数,随机计数 5 个视野的穿膜细胞。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期 取加入不同浓度 GS-Rd 溶液培养 24 h 的 A549 细胞,以 1000 r/min 离心 5min,弃上清,经 PBS 洗涤细胞 3 次,离心弃上清,加入 PBS 重悬制备单细胞悬液,加入预冷 75% 乙醇,边振荡边加,于 4℃ 固定过夜。用 PBS 重新洗去乙醇,离心收集细胞,加入 100 μ g/ml RNase 15 μ l,涡旋振荡混合均匀,4℃ 避光放置 15 min,加入含 50 μ g/ml PI 的 PBS 共 500 μ l,4℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。实验结果重复 3 次以上。

1.7 Western blotting 检测 收集转染 24 h 后的各组细胞,向每孔细胞中加入 200 μ l 细胞裂解液提取总蛋白,每组取 80 μ g 的蛋白,加入上样缓冲液煮沸 5 min,进行 10%SDS-PAGE 电泳,采用半干转法将凝胶上的蛋白转移至 NC 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 1:1000 稀释的一抗,4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液充分洗膜后,再加入 HRP 标记的羊抗兔或羊抗小鼠的二抗(1:4000),置于摇床上室温孵育 1 h,取适量的 ECL 试剂化学发光显影,在凝胶成像仪内成像,拍照。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 版软件进行统计学处理。数据采用均数 \pm 标准差表示,两组间比

较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞增殖的影响 MTT 法结果显示,12.5、25、50、100 μ mol/L GS-Rd 处理 A549 细胞后的 24 h 增殖抑制率分别为 3.54%、18.25%、26.58% 和 32.38%,48 h 增殖抑制率分别为 21.91%、27.15%、40.37% 和 46.44%。随着药物浓度的增加,其增殖抑制率也随之增加,呈剂量-时间依赖性($P<0.05$)。25~100 μ mol/L GS-Rd 对 A549 细胞的增殖抑制率与 DDP 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 不同浓度 GS-Rd 对 A549 细胞的增殖抑制作用

组别	24 h		48 h	
	A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)
空白组	0.9130 \pm 0.071	—	0.8900 \pm 0.067	—
DDP 组	0.6683 \pm 0.028	26.80	0.5743 \pm 0.143	35.47
GS-Rd 组				
12.5 μ mol/L	0.8807 \pm 0.071	3.54	0.6950 \pm 0.075	21.91
25 μ mol/L	0.7463 \pm 0.053	18.25*	0.6483 \pm 0.055	27.15*
50 μ mol/L	0.6703 \pm 0.035	26.58*	0.5307 \pm 0.113	40.37*
100 μ mol/L	0.6173 \pm 0.031	32.38*	0.4767 \pm 0.159	46.44*

注:与 12.5 μ mol/L 组比较,* $P<0.05$

2.2 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响 Hoechst 33258/Alexa Fluor 488 Annexin-V/PI 标记法结果显示,空白组细胞核亮染的数目很少,核形态饱满,GS-Rd 组细胞核出现高亮染块状荧光,且随着药物浓度的增加,亮染细胞数目明显增多。从荧光强度可看出,与空白组比较,随着药物浓度的增加,A549 细胞凋亡的数目增多,且呈时间-剂量依赖性。3 种标记法的荧光强度值结果显示,随着药物浓度的增加,GS-Rd 对 A549 细胞凋亡的影响越明显。见图 1、表 2。

表 2 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	Hoechst 荧光强度		Annexin-V 荧光强度		PI 荧光强度	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
空白组	8.06 \pm 0.13	8.26 \pm 0.02	814.51 \pm 4.55	857.20 \pm 33.09	928.68 \pm 29.20	1002.89 \pm 66.34
GS-Rd 组						
12.5 μ mol/L	8.36 \pm 0.15	8.49 \pm 0.18	1018.86 \pm 121.30	1167.65 \pm 218.79	1370.31 \pm 175.21	1758.77 \pm 480.22
25 μ mol/L	8.53 \pm 0.17	8.71 \pm 0.13	1132.36 \pm 24.48	2031.42 \pm 170.96	4235.76 \pm 813.70	14 107.99 \pm 2569.56
50 μ mol/L	8.85 \pm 0.05	8.94 \pm 0.14	2263.90 \pm 30.85	3354.65 \pm 177.72	5973.15 \pm 803.29	21 556.80 \pm 5027.68

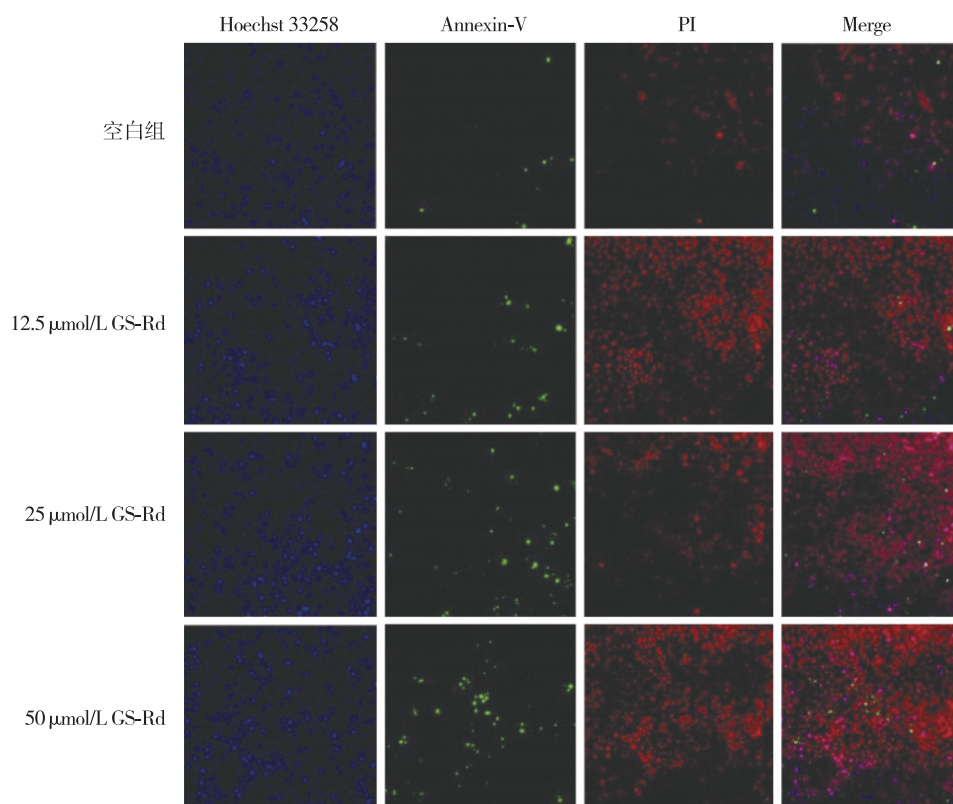


图 1 GS-Rd 作用 48 h 后肺癌 A549 细胞凋亡情况

2.3 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞侵袭的影响

Transwell 小室结果显示, 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ GS-Rd 作用 A549 细胞后的穿膜细胞数分别为 (78.2 ± 16.32) 个、 (57.0 ± 10.37) 个、 (42.8 ± 15.98) 个, 空

白组为 (89.8 ± 12.87) 个。与空白组比较, GS-Rd 组的侵袭细胞数明显减少, 并呈浓度依赖性, 其中 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 两个剂量组的侵袭细胞数较空白组显著减少 ($P < 0.01$)。见图 2、表 3。

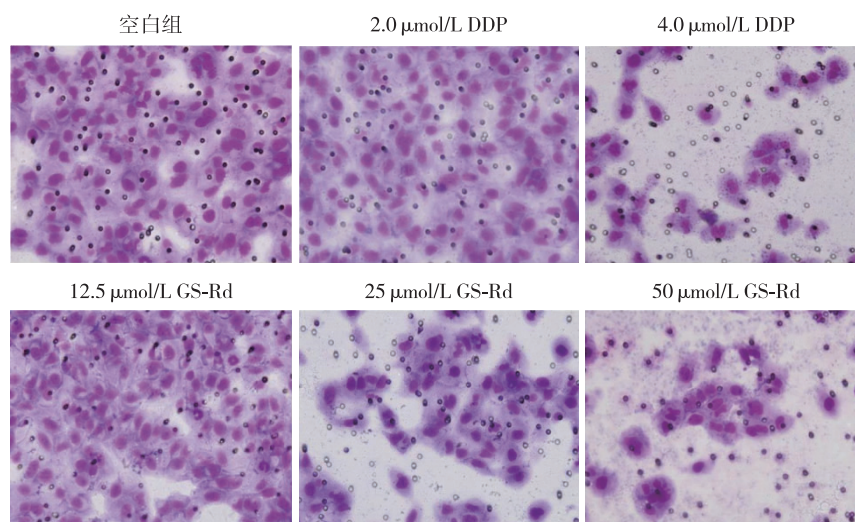


图 2 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响

表 3 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	侵袭细胞数(个)
空白组	89.8±12.87
DDP 组	
2.0 μg/ml	88.2±1.92
4.0 μg/ml	14.8±3.96*
GS-Rd 组	
12.5 μmol/L	78.2±16.32
25 μmol/L	57.0±10.37*
50 μmol/L	42.8±15.98*

注:与空白组比较,* $P<0.01$

2.4 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞周期的影响

12.5、25、50、100 μmol/L GS-Rd 作用于 A549 细胞 24 h 后,流式细胞仪检测结果显示, G_0/G_1 期细胞比例逐渐上升,而 S 期细胞比例逐渐下降, G_2/M 期细胞比例趋势不明显。Western blotting 检测结果显示,随着药物浓度增加,E2F1、cyclin D1、cyclin E1、CDK4、CDK2、p-Akt 的蛋白表达水平平均下调,p27、p21 随着浓度的增加表达水平上调。见图 3~图 5。

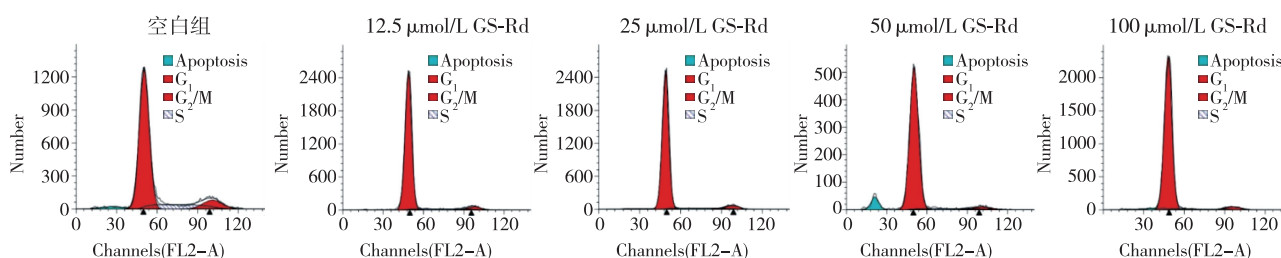


图 3 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞周期的影响

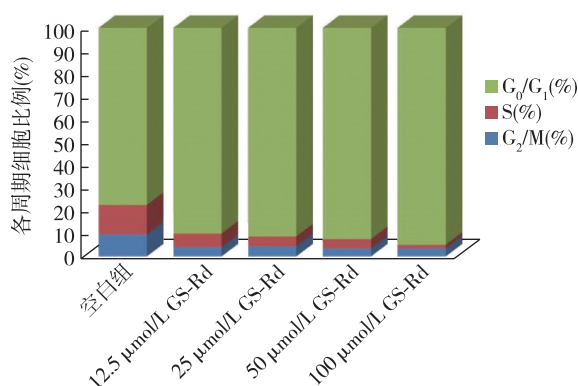
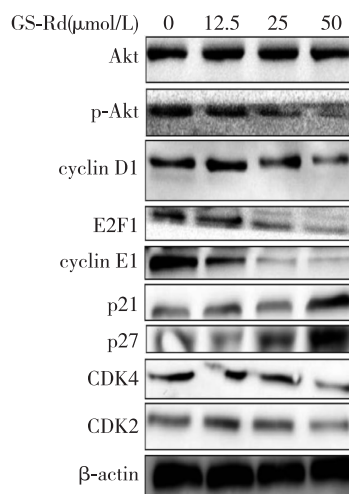


图 4 GS-Rd 作用 24 h 后肺癌 A549 细胞周期分布情况



注:与空白组比较,* $P<0.01$

图 5 不同浓度 GS-Rd 对肺癌 A549 细胞周期相关蛋白表达的影响

3 讨论

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因,而 NSCLC 占 80%,含铂两药的方案是一线标准治疗方案,但患者经常无法耐受化疗相关毒性,因此探求有效、低毒的抗肿瘤药物一直是人们关注的焦点。人参是一种中草药,人参皂苷是主要的活性成分,已鉴定出 40 多种人参皂苷化合物,其中最常见的是 Rb1、Rg1、Rg3、Rd 和 Rh1,它们似乎具有很强的生物活性。

GS-Rd 是一种有效的抗肿瘤药物,Zhang 等^[7]

发现 GS-Rd 呈剂量依赖性地抑制人乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7、MDA-MB-468 细胞的增殖,并通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞凋亡。Yang 等^[8]报道了 GS-Rd 可抑制人类宫颈癌 HeLa 细胞增殖,并呈浓度和时间依赖性。并通过下调 Bcl-2 表达、上调 Bax 表达、降低线粒体跨膜电位和激活 Caspase-3 途径来诱导细胞凋亡。Lee 等^[9]通过 MTT 法发现 GS-Rd 在 HT29 结肠

癌细胞中具有显著的抗增殖活性,使抑制有丝分裂的蛋白质显著上调和下调,并且引起细胞凋亡相关蛋白亦发生了变化。Gu 等^[10]发现 GS-Rd 可抑制人胶质瘤 U251 细胞增殖,促进细胞凋亡,其潜在机制可能与抑制端粒酶活性、下调 Bcl-2 和 hTERT 的表达以及上调人胶质瘤 U251 细胞 Caspase-3 的表达有关。Kim 等^[11]发现 GS-Rd 可抑制人胃癌 AGS 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖和存活,并增强 Caspase-3 活性、线粒体去极化和亚 G1 种群,抑制两种细胞的褪黑素型瞬时受体电位 7 (TRPM7) 样电流,提示 GS-Rd 可能通过抑制 TRPM7 通道活性来抑制胃癌细胞和乳腺癌细胞的增殖和存活。本研究使用 MTT 法在不同时间和浓度下测定了 A549 细胞的生存能力。结果表明,GS-Rd 作用 A549 细胞呈显著的时间和剂量依赖性,并且在 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组抑制能力最明显。在本研究中,利用高内涵分析软件,分析 GS-Rd 作用 24、48 h 对 A549 细胞凋亡的影响。Hoechst 33258 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,该染料与 DNA 结合,进入凋亡细胞较多。Annexin V 是细胞内蛋白膜联蛋白家族的成员,与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。将 Annexin V 与 PI 匹配使用,可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来。

Phi 等^[12]选择人肠癌细胞 HT29 和 SW620 细胞系,Transwell 实验显示与空白对照组比较,GS-Rd 显著降低了细胞侵袭率(30%~78%),并发现其可能通过下调肿瘤干细胞(CSC)和上皮间充质转化(EMT)标记来抑制结直肠癌细胞系的迁移从而抑制其转移,小鼠体内试验亦进一步证实。Yoon 等^[13]发现 GS-Rd 可抑制人类肝细胞癌 HepG₂ 细胞的迁移和侵袭,并可能通过降低基质金属蛋白酶 1, 2, 7(MMP-1、MMP-2 和 MMP-7)的表达以及抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)和有丝分裂原激活的蛋白激酶(p38 MAPK)的磷酸化来阻断 MAPK 信号传导,通过抑制 AP-1 活化以及诱导黏着斑蛋白的形成和表达来参与癌细胞的迁移。Wang 等^[14]通过小鼠乳腺癌 4T1 细胞实验,发现 GS-Rd 可通过抑制 miR-18a 介导的 Smad2 表达来减少乳腺癌转移。本研究 Transwell 实验显示,不同浓度(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) GS-Rd 作用 A549 细胞的侵袭细胞数均低于空白组,表明 GS-Rd 抑制了 A549 细胞的侵袭,且随着药物浓度的增加,其抑制作用亦越强。

细胞周期阻滞是调节肿瘤生长的另一个关键

机制。Yang 等^[8]通过流式细胞术发现宫颈癌 HeLa 细胞经 GS-Rd 处理后,其细胞周期分布特征是 G₀/G₁ 期细胞减少, S 期细胞增加,并呈剂量依赖性。Tian 等^[15]以 SGC-7901 和 MKN-45 胃癌细胞株为例,发现其通过下调细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 诱导细胞停滞在 G₀/G₁ 阶段。本研究的流式细胞术结果显示,经 GS-Rd 处理 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞比例逐渐上升,而 S 期细胞比例逐渐下降, G₂/M 期细胞比例趋势不明显。

在细胞周期的不同阶段,相应的细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs)依次协调 DNA 复制和细胞分裂^[16]。G₁ 期是接受细胞外信息决定进入有丝分裂还是进入静息状态(G₀)的关键时期,即限制点(restriction point, R 点)。而 cyclin D/CDK4、cyclin E/CDK2 是 G₁ 期进行的限速步骤,CDK2、CDK4 的激活可产生许多细胞周期相关蛋白,从而启动 G₁ 期并进入 S 期。p21、p27 是调控细胞周期的相关蛋白,同属于 CDK 抑制因子(CDKI),对细胞周期进行负调控。E2F1 是一种细胞转录活化因子,它是细胞周期 G₁ 期向 S 期过渡的重要调控因子^[17]。当增殖刺激发生时,通过周期依赖性激酶使成人视网膜瘤母细胞瘤易感基因(Rb)磷酸化上调,释放 E2F1, Rb 通过与 E2F1 等转录因子结合而抑制 DNA 合成所必需的蛋白的基因转录,使细胞停滞于 G₁ 期,不再进行有丝分裂。本研究 Western blotting 检测结果显示,GS-Rd 处理 24 h 后, p21、p27 上调, CDK2、CDK4 被抑制, E2F1 表达下调, 且 cyclin D1、cyclin E1 蛋白表达下降,阻滞了细胞周期进程。

除了通过降低 cyclin D、cyclin E 及 CDK 的表达来抑制肿瘤细胞生长外,还通过改变磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/丝氨酸蛋白激酶(AKT)信号转导通路来抑制细胞增殖。PI3K/AKT 通路是调控细胞增殖的重要转导通路之一^[18-19]。PI3K/AKT 通路在肿瘤细胞 G₁ 期到 S 期转变时异常活跃,可以调节 p21^{Cip1}、cyclin D、p27^{Kip1} 的蛋白稳定性^[20]。Akt 是该通路中的关键基因, Akt 磷酸化(p-Akt)激活下游靶分子,使通道活性增加。由此推测经 GS-Rd 处理后的细胞, Akt 磷酸化水平降低。

本研究揭示了 GS-Rd 的肿瘤抑制功能是通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期来调节肿瘤生长。因此,我们推测 GS-Rd 具有良好的实验前景及药用价值。

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.
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204):1145-1158.
- [3] Arbour KC, Riely KC. Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer: A review[J]. JAMA, 2019, 322(8):764-774.
- [4] Wan Q, Ma X, Zhang ZJ, et al. Ginsenoside reduces cognitive impairment during chronic cerebral hypoperfusion through brain-derived neurotrophic factor regulated by epigenetic modulation[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(4):2889-2900.
- [5] Zhang G, Xia F, Zhang Y, et al. Ginsenoside Rd is efficacious against acute ischemic stroke by suppressing microglial proteasome-mediated inflammation[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(4):2529-2540.
- [6] Liu X, Wang L, Wen A, et al. Ginsenoside-Rd improves outcome of acute ischaemic stroke-a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial[J]. Eur J Neurol, 2012, 19(6):855-863.
- [7] Zhang E, Shi H, Yang L, et al. Ginsenoside Rd regulates the Akt/mTOR/p70S6K signaling cascade and suppresses angiogenesis and breast tumor growth[J]. Oncology Reports, 2017, 38(1):359-367.
- [8] Yang ZG, Sun HX, Ye YP. Ginsenoside Rd from panax notoginseng is cytotoxic towards HeLa cancer cells and induces apoptosis[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(2):187-197.
- [9] Lee SY, Kim GT, Roh SH, et al. Proteome changes related to the anti-cancer activity of HT29 cells by the treatment of ginsenoside Rd[J]. Pharmazie, 2009, 64(4):242-247.
- [10] Gu B, Wang JP, Song YQ, et al. The inhibitory effects of ginsenoside Rd on the human lioma U251 cells and its underlying mechanisms[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3):4444-4450.
- [11] Kim BJ. Involvement of melastatin type transient receptor 7 channels in ginsenoside Rd-induced apoptosis in gastric and breast cancer cells[J]. J Ginseng Res, 2013, 37(2):201-219.
- [12] Phi LTH, Sari IN, Wijaya YT, et al. Ginsenoside Rd inhibits the metastasis of colorectal cancer via epidermal growth factor receptor signaling axis[J]. IUBMB Life, 2019, 71(5):601-610.
- [13] Yoon JH, Choi YJ, SW Lee, et al. Anti-metastatic effects of ginsenoside Rd via inactivation of MAPK signaling and induction of focal adhesion formation[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3-4):284-292.
- [14] Wang P, Du X, Xiong M, et al. Ginsenoside Rd attenuates breast cancer metastasis implicating derepressing microRNA-18a regulated Smad2 expression[J/OL]. Sci Rep, 2016[2021-05-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27641158/>.
- [15] Tian YZ, Liu YP, Tian SC, et al. Antitumor activity of ginsenoside Rd in gastric cancer via up-regulation of Caspase-3 and Caspase-9[J]. Pharmazie, 2020, 75(4):147-150.
- [16] Ramos-Garcia P, Gill-Montoya JA, Scully C, et al. An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis[J]. Oral Dis, 2017, 23(7):897-912.
- [17] Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, et al. Expression of E2F-1 and E2F-4 is reduced in primary and metastatic breast carcinomas[J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 69(2):115-122.
- [18] 于宝华, 周晓燕. PI3K/Akt/mTOR 信号传导通路在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(10):674-676.
- [19] Yu JS, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. Development, 2016, 143(17):3050-3060.
- [20] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB(Akt) pathway in cell progression[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4):339-345.

收稿日期:2021-05-22; 修回日期:2021-09-16