

# 人参皂苷对肺癌细胞增殖、凋亡影响及作用机制

张宇辰<sup>1</sup>, 沈继春<sup>2</sup>, 曲雅静<sup>1</sup>, 徐朋朋<sup>1</sup>  
武警特色医学中心 1. 肿瘤科; 2. 内分泌与血液科, 天津 300162

**[摘要]** **目的** 探讨人参皂苷 Rg3 对非小细胞肺癌细胞系 NCI-H292 细胞增殖、凋亡的作用及其与相关信号通路的关系。**方法** 用不同浓度(0、20、40、60 μmol/L)人参皂苷 Rg3 处理 NCI-H292 细胞。CCK8 法检测人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞增殖的影响;流式细胞术检测人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞凋亡的影响;Western blot 检测 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达;反转录聚合酶链反应检测 Keap1 mRNA 和 Nrf2 mRNA 表达,观察人参皂苷 Rg3 对 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的调节作用;通过检测活性氧水平评价细胞内氧化应激水平。**结果** 与对照组(人参皂苷 Rg3 为 0 μmol/L)比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加,细胞的增殖能力和 Nrf2 mRNA 表达下降,细胞的凋亡能力、caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达量、Keap1 mRNA 表达、活性氧水平上升,且均呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。**结论** 人参皂苷 Rg3 可能通过抑制 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路而抑制非小细胞肺癌细胞增殖,并促进其凋亡。

**[关键词]** 人参皂苷; 肺癌; 增殖; 凋亡; Keap1-Nrf2/ARE 信号通路

中图分类号:R73 doi:10.16680/j.1671-3826.2022.01.07 文章编号:1671-3826(2022)01-0023-04

## Effect and mechanism of ginsenosides on proliferation and apoptosis of lung cancer cells

ZHANG Yu-chen<sup>1</sup>, SHEN Ji-chun<sup>2</sup>, QU Ya-jing<sup>1</sup>, XU Peng-peng<sup>1</sup> (1. Department of Oncology; 2. Department of Endocrinology and Hematology, Chinese People's Armed Police Force Characteristic Medical Center, Tianjin 300162, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rg3 on proliferation and apoptosis of NCI-H292 cell line of non-small cell lung cancer(NSCLC)and its relationship with related signaling pathways. **Methods** NCI-H292 cells were treated with ginsenoside Rg3 at different concentrations (0, 20, 40, 60 μmol/L). CCK8 assay was used to detect the effect of ginsenoside Rg3 on NCI-H292 cell proliferation. The effect of ginsenoside Rg3 on apoptosis of NCI-H292 cells was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect caspase-3 and Bcl-2 protein expression. The expressions of Keap1 mRNA and Nrf2 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction, and the regulation of ginsenoside Rg3 on Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway was observed. The level of intracellular oxidative stress was evaluated by reactive oxygen species. **Results** Compared with the control group (ginsenoside Rg3 0 μmol/L), with the increase of ginsenoside Rg3 concentration, cell proliferation and Nrf2 mRNA expression decreased, apoptosis, caspase-3 and Bcl-2 protein expression, Keap1 mRNA expression and reactive oxygen species increased, and all of them were concentration-dependent ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rg3 may inhibit the proliferation of lung cancer NCI-H292 cells and promote their apoptosis by inhibiting the expression of Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway.

**Key words:** Ginsenoside; Lung cancer; Proliferation; Apoptosis; Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway

肺癌是目前全世界发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁人类的生命健康<sup>[1]</sup>。在我国,肺癌的发病率及死亡率也居于恶性肿瘤首位<sup>[2]</sup>,很多患者在发现时已经处于晚期,错过了最佳治疗时机,无法进行手术治疗,常规放疗和化疗效果也不佳,导致 5 年生存率低。肺癌细胞的无限增殖、转移及对化疗药物的耐药是影响治疗效果和患者生存率的重要因素。近年来,随着诊断和检

测水平的不断提高,肺癌的发病机制在分子水平研究不断加深,关键的信号调控通路异常与肺癌的发生具有密切关系已被证实。Keap1/Nrf2 信号通路是一条重要的抗氧化保护性通路,主要包括 Keap1、Nrf2 及抗氧化反应原件 ARE<sup>[3]</sup>。有研究表明,人类肺癌组织中存在 Keap1、Nrf2/ARE 基因突变<sup>[4]</sup>,导致肺癌 Keap1-Nrf2/ARE 通路活化,参与肺癌的生物学行为,包括减少癌细胞凋亡、促进癌细胞增殖、介导癌细胞耐药等<sup>[5]</sup>。人参皂苷是人参的主要活性成分,具有抗炎、抗过敏、抗衰老、保护神经等药理作用<sup>[6-8]</sup>。有学者发现,人参皂苷可以减少癌细

基金项目:天津市卫生局科技基金(重点项目)(2013kR07)  
第一作者:张宇辰(1989-),女,内蒙古人,医师  
通信作者:沈继春, E-mail: shenjichun123@163.com

胞增殖并促进其凋亡,抑制癌细胞血管生成<sup>[9-11]</sup>。本研究旨在探讨人参皂苷 Rg3 对非小细胞肺癌细胞系 NCI-H292 细胞增殖、凋亡的作用及其与相关信号通路 Keap1-Nrf2/ARE 的关系。现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 非小细胞肺癌细胞系 NCI-H292 购自中国科学院细胞细胞库;人参皂苷 Rg3 购自上海叶源生物公司;胎牛血清、RPMI1640 细胞培养液购自美国 Gibco 公司;青霉素链霉素双抗、PBS 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司;CCK8 增殖试剂盒购自上海贝博生物技术公司;活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司;基因引物由上海生工科技有限公司合成;TH4-200 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司),流式细胞仪(美国 Beckman Coulter Altra 公司)。

1.2 细胞培养 将细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液进行培养,定期更换培养液,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内,待细胞长满瓶底面积 80%,加入胰酶消化并传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 CCK-8 增殖 取生长对数期的细胞,以  $2 \times 10^4$  每孔的细胞数接种于 96 孔板中,置于 37 ℃ 温箱中培养,设立对照组(人参皂苷组 0 μmol/L)、人参皂苷组(20、40、60 μmol/L),培养 24 h 后,按以下公式计算细胞倍增时间(doubling time, DT)。每孔加入 20 μl 的 CCK-8 溶液,避光孵育 30 min。采用酶标仪在 450 nm 波长下测定各个孔的吸光度,检测增殖能力。

$DT = \text{细胞培养时间} \times \log_2 / \log(\text{最终细胞数量} / \text{初始细胞数量})$

1.4 细胞凋亡能力 取生长对数期的细胞,加入人参皂苷 Rg3(0、20、40、60 μmol/L)作用 24 h 后, PBS 洗涤细胞 3 次后胰酶消化并收集细胞,离心后弃去上清,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 染液,混匀后再加入 10 μl 的碘化丙啶染色,混匀。37 ℃ 下静置 4 min,流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.5 反转录聚合酶链反应检测相关 mRNA 表达 取生长对数期的细胞,加入人参皂苷 Rg3(0、20、40、60 μmol/L)作用 24 h 后,按照试剂盒说明进行 RNA 提取并逆转录为 cDNA,实时反转录聚合酶链反应测定 Keap1、Nrf2 的表达量。Keap1:上游 3'-TTCAAGCCGCGAGTTGCTCA-5',下游 3'-TTAGT-CACCAGCGGGACG-5'。Nrf2:上游 3'-GACTCTAC-CACTGTTCCCAA-5',下游 3'-CCATTCT-

TATTCACCGACG-5'。Beta-actin:上游 3'-TCAG-GTCATCACTATCGGCAAT-5',下游 3'-AAA-GAAAGGGTGTAACGCA-5'。

1.6 Western blot 检测相关蛋白表达 取生长对数期的细胞,加入人参皂苷 Rg3(0、20、40、60 μmol/L)作用 24 h 后,加入细胞裂解液,利用超声破碎仪进行破碎,在 12 000 r/min、4 ℃ 条件下离心 15 min,取上清,每孔 20 μg 蛋白样品量上样。SDS-PAGE 电泳进行蛋白分离,再转移蛋白至 PVDF 膜上,5% 胎牛血清封闭 2 h, caspase-3、Bcl-2、Beta-actin 抗体 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后加入荧光二抗孵育 2 h。采用 UVI 凝胶成像分析系统测量条带光密度;以 Beta-actin 为内参,以目的蛋白和内参蛋白的光密度比值为目的蛋白的相对表达量。

1.7 活性氧水平检测 取生长对数期的细胞,加入人参皂苷 Rg3(0、20、40、60 μmol/L)作用 24 h 后,每组收集  $1 \times 10^6$  个细胞,洗涤后重悬于 PBS 中,加入 10 mmol/L 的 DCFH-DA,使细胞终浓度为 1 μmol/L,37 ℃ 避光温育 20 min, PBS 洗涤后重悬,流式细胞仪检测荧光强度。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件对数据进行处理。计量资料组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞增殖影响 与对照组比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加,细胞增殖能力下降,且呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞凋亡影响 与对照组比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加,细胞凋亡能力上升,且呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。见图 2。

2.3 人参皂苷 Rg3 对 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达量影响 与对照组比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加, caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达量上升,且呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。见图 3。

2.4 人参皂苷 Rg3 对 Keap1 mRNA 和 Nrf2 mRNA 影响 与对照组比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加, Keap1 mRNA 表达上升, Nrf2 mRNA 表达下降,且呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。见图 4。

2.5 人参皂苷 Rg3 对细胞内氧化应激水平影响 与对照组比较,随着人参皂苷 Rg3 浓度增加,活性氧水平上升,且呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。见图 5。

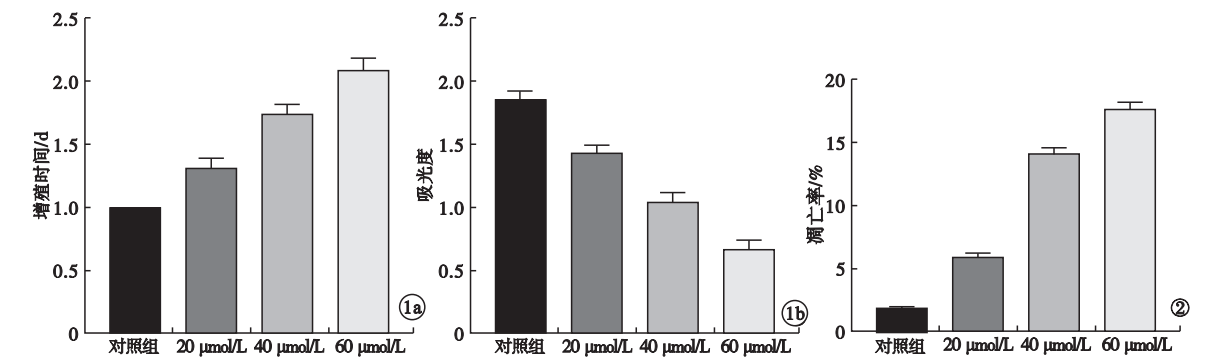


图 1 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞增殖影响 图 2 人参皂苷 Rg3 对 NCI-H292 细胞凋亡影响

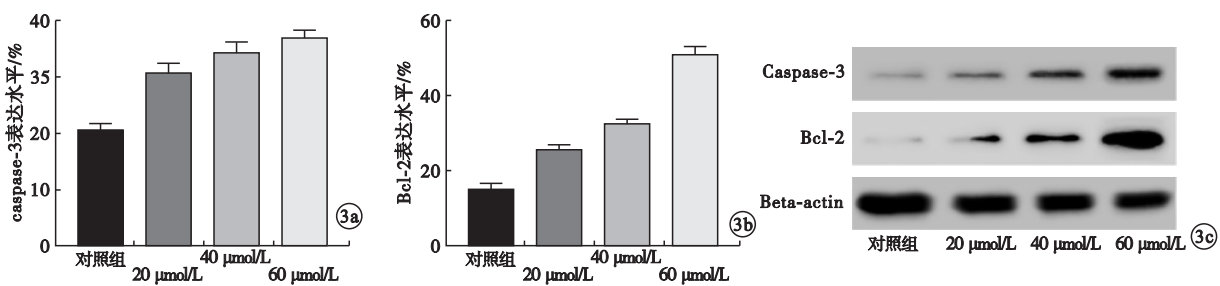


图 3 人参皂苷 Rg3 对 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达量影响

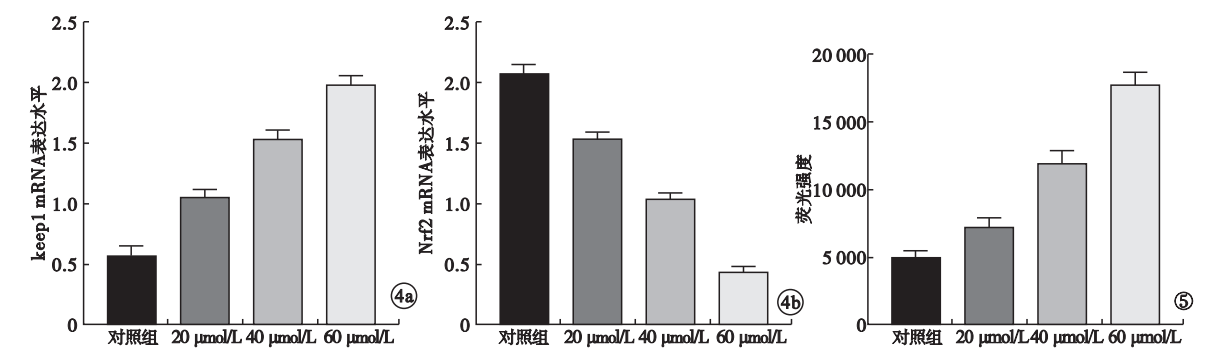


图 4 人参皂苷 Rg3 对 Keap1 mRNA 和 Nrf2 mRNA 影响 图 5 人参皂苷 Rg3 对细胞内氧化应激水平影响

3 讨论

根据我国癌症中心统计,2015 年,我国有 73.3 万例肺癌新发病例,死亡病例达到 61.0 万,严重威胁人类健康<sup>[12]</sup>。肺癌患者预后不良、生存率低与患者多在晚期发现、肿瘤组织对化疗药物耐药等密切相关<sup>[13]</sup>。因此,深入探讨肺癌细胞的增殖、凋亡、耐药机制对于肺癌的诊断、治疗及新型靶向药物的研究具有重要意义。

人参是我国传统中药成分之一,其主要活性成分为人参皂苷。人参皂苷 Rg3 具有抑制肺癌细胞血管生成的作用,主要机制是通过降低血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9 等血管新生诱导因子表达抑制癌细胞血管生成<sup>[14-15]</sup>。人参皂苷还可以降低多药耐药基因、P 糖蛋白的表达,提高其对化疗药物的敏感性<sup>[16-17]</sup>。

细胞凋亡途径分为受体介导的细胞凋亡途径及线粒体介导的细胞凋亡途径,Bcl-2 和 caspase-3 是线粒体介导的细胞凋亡途径中的两种调节蛋白。Bcl-2 家族的两种促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 可使线粒体外膜通透化,导致下游 caspase-3 以及核酸酶等被活化,随之维持细胞生存的蛋白质和核酸被降解,细胞凋亡发生。Keap1-Nrf2/ARE 信号通路是一条机体抗氧化应激及活性氧物质的重要通路。Nrf2 是细胞内调节氧化应激的主要转录因子,存在于肝、肾、消化道、皮肤、肺<sup>[18]</sup>。Keap1 属于 Kelch 家族多区域阻遏蛋白,位于 19p13.2 位点,是 Nrf2 的关键负调节因子<sup>[19]</sup>。ARE 是一个 DNA 启动子结合序列,Nrf2 可以激活该启动子序列,当 ARE 序列被激活时,受 ARE 调控的相关基因开始转录并诱导靶基因表达,包括代谢、细胞内氧化还原平衡、凋

亡及自噬,从而发挥保护作用<sup>[20]</sup>。有研究表明,Nrf2 过表达和 Keap1 表达缺失在非小细胞肺癌患者中十分常见,且与临床不良预后、对顺铂耐药等密切相关<sup>[21]</sup>。癌细胞会产生大量活性氧,过量活性氧会导致细胞核氧化损伤,Nrf2 可以减少氧化应激,从而减少细胞凋亡,当 Keap1 表达缺失时,Nrf2 过表达,导致癌细胞抗氧化应激能力增强,凋亡减少<sup>[5]</sup>。此外,Nrf2 可调节成纤维细胞生长因子-13、转化生长因子- $\beta$ 1/转化生长因子- $\beta$ 2 等生长因子,因此,当 Nrf2 过表达时,还可促进癌细胞增殖<sup>[22-23]</sup>。某些类型肺癌患者存在 Keap1 突变,导致其蛋白终止密码子提早出现,引起氨基酸种类和数量改变,最终导致 Keap1 功能缺失,丧失了对 Nrf2 的负性调控,促进了肿瘤的发生发展<sup>[24]</sup>。

本研究结果发现:人参皂苷 Rg3 可抑制 NCI-H292 增殖,促进 NCI-H292 凋亡,且作用呈浓度依赖性;人参皂苷 Rg3 还会使细胞内抗氧化机制减弱,出现活性氧蓄积;上述改变可能与 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路相关。

综上所述,人参皂苷 Rg3 可能通过抑制 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路而抑制非小细胞肺癌细胞增殖,并促进其凋亡。

#### 参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] 朱学应, 马冬春, 王保明, 等. 非小细胞肺癌中 Keap1-Nrf2 信号通路蛋白的表达及与临床病理相关性分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2018, 22(9): 938-942.
- [4] Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer[J]. Trends Biochem Sci, 2009, 34(4): 176-188.
- [5] 刘金华, 赖玉珍, 张伟. Keap1-Nrf2/ARE 通路在肺癌中的研究进展[J]. 广东医学, 2018, 39(4): 633-636.
- [6] Ahuja A, Kim JH, Kim JH, et al. Functional role of ginseng-derived compounds in cancer[J]. J Ginseng Res, 2018, 42(3): 248-254.
- [7] Muthukumar T, Aravinthan A, Sharmila J, et al. Collagen/chitosan porous bone tissue engineering composite scaffold incorporated with ginseng compound K[J]. Carbohydr Polym, 2016, 15(2): 566-574.
- [8] Yang L, Zhang Z, Hou J, et al. Targeted delivery of ginsenoside compound K using TPGS/PEG-PCL mixed micelles for effective treatment of lung cancer[J]. Int J Nanomed, 2017, 12(7): 653-656.
- [9] Li Y, Zhou T, Ma C, et al. Ginsenoside metabolite compound K en-

hances the efficacy of cisplatin in lung cancer cells[J]. J Thoracic Dis, 2015, 7(3): 398-400.

- [10] Wei S, Li W, Yu Y, et al. Ginsenoside compound K suppresses the hepatic gluconeogenesis via activating adenosine-5' monophosphate kinase: a study in vitro and in vivo[J]. Life Sci, 2015, 13(9): 8-15.
- [11] Yang L, Xin J, Zhang Z, et al. TPGS-modified liposomes or the delivery of ginsenoside compound K against non-small cell lung cancer: formulation design and its evaluation in vitro and in vivo[J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(9): 1109-1118.
- [12] Zhang K, Li Y. Effects of ginsenoside compound K combined with cisplatin on the proliferation, apoptosis and epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells of human breast cancer[J]. Pharm Biol, 2016, 54(4): 561-568.
- [13] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [14] 高勇, 王杰军, 许青, 等. 人参皂甙 Rg3 抑制肿瘤新生血管形成机制研究[J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(3): 179-181.
- [15] 李焯婷, 唐有为. 人参皂甙 Rg3 体外通过抑制 Wnt/ $\beta$  联蛋白通路阻止胃癌 SGC7901 细胞血管生成拟态的形成[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(5): 518-523.
- [16] 吴艳林, 刘润田. 人参皂甙 Rh2 对人肝癌细胞 HepG2/ADM 耐药逆转作用及其机制研究[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(5): 476-480.
- [17] 李萍, 陈善. 人参皂甙 Rh2 逆转 MCF-7/ADM 多药耐药性的研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(21): 8-10.
- [18] Moi P, Chan K, Asunis I, et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(21): 9926-9930.
- [19] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [20] Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13(11): 1713-1748.
- [21] Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(14): 3743-3753.
- [22] Reddy NM, Kleeberger SR, Bream JH, et al. Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling[J]. Oncogene, 2008, 27(44): 5821-5832.
- [23] Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, et al. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7975-7984.
- [24] Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer[J]. PLoS Med, 2006, 3(10): e420.

(收稿日期: 2021-09-02, 本文编辑: 关婷婷)