

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.009

· 基础研究 ·

人参皂苷 Rg3 协同 TRAIL 促进肺癌 H358 细胞凋亡的机制

安辉, 李思思, 高野, 梁春光(锦州医科大学附属第一医院 神经外科, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] **目的:**探讨人参皂苷 Rg3 联用肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)对肺癌 H358 细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法:**肺癌 H358 细胞培养完成后, 0、50、100、200 ng/ml TRAIL 或 0、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ Rg3 作用 H358 细胞 48 h, 按照实验方法分为对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3 组、100 ng/ml TRAIL 组及 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL 组。MTT 法检测 Rg3 和/或 TRAIL 对肺癌 H358 细胞增殖的影响, DAPI 染色荧光倒置显微镜观察 Rg3 和/或 TRAIL 对肺癌 H358 细胞形态学变化的影响, 流式细胞术检测 Rg3 和/或 TRAIL 对肺癌 H358 细胞凋亡的影响, WB 实验检测 Rg3 和/或 TRAIL 对各组肺癌 H358 细胞内死亡受体(DR5)及 caspase-8 表达的影响。**结果:** 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL 组与其他各组比较, 肺癌 H358 细胞的增殖抑制最明显($P<0.05$); DAPI 染色后显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL 组多数细胞核皱缩, 染色质凝集, 荧光强度增加, 并出现饱和和碎裂等晚期凋亡形态学改变; 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL 组与其他各组比较, 细胞凋亡率升高最明显, 细胞内 DR5 及 caspase-8 表达增强最明显(均 $P<0.05$)。**结论:** 人参皂苷 Rg3 联合 TRAIL 能够协同抑制肺癌 H358 细胞的增殖及诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与人参皂苷 Rg3 协同促进 DR5 及 caspase-8 的表达上调有关。

[关键词] 肺癌; H358 细胞; 人参皂苷 Rg3; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 凋亡

[中图分类号] R739.12; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)09-0988-05

Ginsenoside Rg3 synergistically promotes apoptosis of lung cancer H358 cells with TRAIL and its mechanism

ANN Hui, LI Sisi, GAO Ye, LIANG Chunguang (Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ginsenoside Rg3 combined with TRAIL on the apoptosis of lung cancer H358 cells and its possible mechanism. **Methods:** After the completion of cell culture, H358 cells were treated with TRAIL (0, 50, 100, 200 ng/ml) or Rg3 (0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, and the cells were grouped according to different treatments, namely control group, 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3 group, 100 ng/ml TRAIL group and 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL group. The effects of Rg3 and/or TRAIL on the proliferation of H358 cells were detected by MTT assay. The effects of Rg3 and/or TRAIL on the morphological changes of H358 cells were observed by DAPI staining. The apoptosis of H358 cells in each group was detected by flow cytometry. The effects of Rg3 and/or TRAIL on the expressions of death receptor 5 (DR5) and caspase-8 in H358 cells were detected by WB. **Results:** Compared with the other groups, the proliferation of lung cancer H358 cells was significantly inhibited, while the apoptosis was significantly elevated in the 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL group ($P<0.05$). After color developing, cells in 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL group had nuclear shrinkage, chromatin condensation, increased fluorescence intensity, and late morphological changes such as saturation fragmentation. Compared with the other groups, the expression levels of DR5 and caspase-3, 8 in the cells of 50 $\mu\text{mol/L}$ Rg3+100 ng/ml TRAIL group were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Ginsenoside Rg3 combined with TRAIL can synergistically inhibit the proliferation and induce apoptosis of lung cancer H358 cells. The mechanism may be related to the up-regulation of DR5 and caspase-8 by ginsenoside Rg3.

[Key words] lung cancer; H358 cell; ginsenoside Rg3; TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL); apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(9):988-992. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.09.009]

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 超家族成员之一, TRAIL 又称凋亡素 2 配体(Apo2L), 可以在促进肿瘤细胞凋亡的同时不影响正常细胞的活性。研

[作者简介] 安辉(1980-), 女, 硕士, 主要从事临床肿瘤治疗的研究, E-mail: anda55299@163.com

[通信作者] 梁春光(LIANG Chunguang, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤药理的研究, E-mail: amilyliang@163.com

究^[1-3]发现,虽然 TRAIL 能促进肿瘤细胞凋亡,但肿瘤细胞对其存在一定的耐药性,这限制了 TRAIL 的进一步应用。近年来研究^[4-5]证实,通过联合化疗可增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性而降低其耐药性。人参皂苷 Rg3 是从人参中提取出来的重要有效成分之一,Rg3 不但具有较强的抗肿瘤作用,用时还能逆转其他化疗药物引起的肿瘤细胞耐药性^[6-7]。目前关于人参皂苷 Rg3 是否能增强肺癌细胞对 TRAIL 敏感性的研究尚未见报道。本研究选用肺癌细胞株 H358,观察 TRAIL 和人参皂苷 Rg3 单用及两者联用对肺癌 H358 细胞细胞增殖、凋亡的影响,以判断两者联用的疗效,并对其机制进行初步探讨,为肺癌临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料、细胞株及主要试剂

人参皂苷 Rg3(大连富生天然药物开发有限公司)。肺癌 H358 细胞(上海细胞库)。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(欣博盛生物科技有限公司),鼠抗人 DR4、5 单克隆抗体、兔抗人 caspase-3、8 单克隆抗体(Abcam 公司),山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 细胞培养

肺癌 H358 细胞置于 37 °C 水浴复苏,5% CO₂、37 °C 培养箱内培养。每 2 d 更换培养液,细胞呈上皮样贴壁生长。待细胞汇合度达到 80%~90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化 1~2 min,去胰酶,加入 10% 胎牛血清的 Leibovitz's L-15 培养基,终止消化。用吸管吸取培养液,反复吹打贴壁细胞,使细胞脱离瓶壁充分分散,将细胞悬液按 1:2 稀释后传代。

1.3 MTT 法检测肺癌 H358 细胞的增殖能力

取对数期生长的肺癌 H358 细胞,胰酶消化,调整细胞密度至 5×10^4 /ml,接种于 96 孔板中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养。按 0、50、100、200 ng/ml TRAIL 或 0、25、50、100 μ mol/L Rg3 添加,每个浓度设 4 个平行孔。各组作用 48 h 后,每孔加入质量浓度为 5 mg/ml MTT 20 μ l,继续培养 4 h。吸去培养液,每孔加入 150 μ l DMSO,避光,振荡 10 min,室温孵育 20 min。放入酶标仪,以 490 nm 波长检测光密度(D)值。细胞增殖率=(实验组 D 值/对照组 D 值)×100%。实验重复 3 次。

1.4 DAPI 染色荧光显微镜观察肺癌 H358 细胞的形态学变化

取对数期生长的细胞,胰酶消化,调整细胞密度至 3×10^5 /ml,接种于 12 孔板中,每孔 1 ml,37 °C、5%CO₂ 条件下培养。药物作用 48 h 后,用 PBS 洗 3

次。4% 多聚甲醛固定 5 min,室温干燥。每孔加入 2 μ g/ml DAPI 0.5 ml,37 °C 避光 15 min,洗 3 次,倒置荧光显微镜观察凋亡细胞。

1.5 流式细胞术检测肺癌 H358 细胞的凋亡率

作用 48 h 后,胰酶消化,调整细胞密度至 1×10^6 /ml,PBS 洗 2 次,重悬。将细胞悬液置于流式管中,加入 5 μ l Annexin V-FITC,混匀,间隔 3 min,加入 10 μ l 20 μ g/ml 的 PI 溶液,于室温避光孵育 10 min,每管加入 400 μ l 1×Binding Buffer,上流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.6 WB 实验检测肺癌 H358 细胞相关蛋白的表达

作用 48 h 后,收集各组细胞,以裂解缓冲液提取细胞总蛋白。每孔 40 μ g 的含量加样,电泳分离。移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉在 37 °C 封闭 2 h。加入鼠抗人死亡受体(death receptor 5, DR5)抗体(1:500)和兔抗人 caspase-8 抗体(1:1 000),4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再加入 HRP 标记山羊抗鼠 IgG(1:200)、山羊抗兔 IgG(1:200),4 °C 孵育 2 h。ECL 发光试剂盒发光显影,凝胶成像,扫描分析灰度值、计算相关蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 和 TRAIL 分别抑制肺癌 H358 细胞的增殖

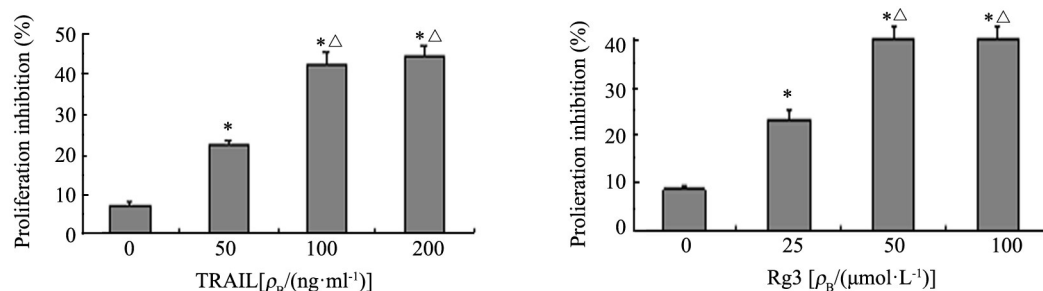
MTT 法检测结果显示,50、100、200 ng/ml TRAIL 作用细胞 48 h,细胞增殖抑制率分别为 $(22.51 \pm 1.02)\%$ 、 $(42.67 \pm 3.31)\%$ 和 $(44.86 \pm 2.62)\%$,与对照组 $(7.34 \pm 0.87)\%$ 比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 1A),但当剂量超过 100 ng/ml 时细胞增殖抑制率无明显变化($P > 0.05$)。25、50、100 μ mol/L 人参皂苷 Rg3 作用细胞 48 h,细胞增殖抑制率分别为 $(23.36 \pm 1.82)\%$ 、 $(40.14 \pm 2.43)\%$ 和 $(39.98 \pm 2.77)\%$,与对照组 $(8.72 \pm 0.62)\%$ 比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 1B);但当剂量超过 50 μ mol/L 时细胞增殖抑制率无明显变化($P > 0.05$)。

2.2 人参皂苷 Rg3 联合 TRAIL 对肺癌 H358 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果(图 2)显示,作用 48 h 后,50 μ mol/L 人参皂苷 Rg3 组、100 ng/ml TRAIL 组和 50 μ mol/L 人参皂苷 Rg3+100 ng/ml TRAIL 组细胞凋亡率分别为 $(12.72 \pm 2.51)\%$ 、 $(11.65 \pm 2.97)\%$ 和 $(28.84 \pm$

3.52)%,与对照组[(3.75±0.87)%]比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。其中人参皂苷Rg3+TRAIL组与TRAIL组或人参皂苷Rg3组比较差异显著(均 $P<$

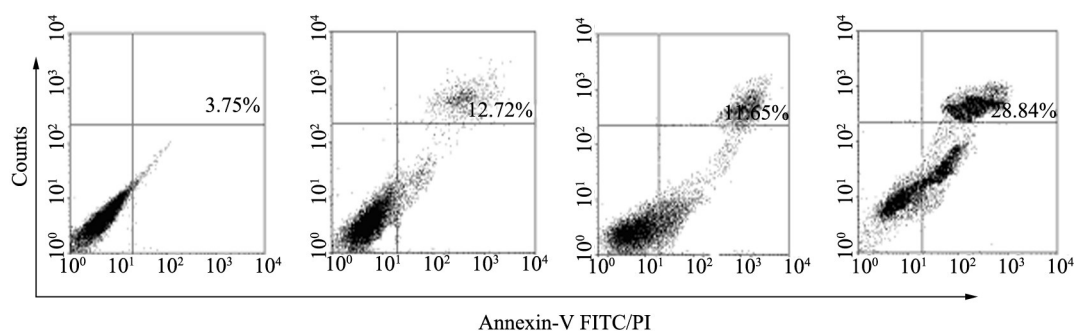
0.05)。上述结果说明,人参皂苷Rg3联合TRAIL能够明显抑制肺癌H358细胞的增殖。



* $P<0.05$ vs Control group; [△] $P<0.05$ vs 50ng/ml TRAIL or 25 μmol/L Rg3 group

图1 人参皂苷Rg3和TRAIL对肺癌H358细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of ginsenoside Rg3 and TRAIL on the proliferation of lung cancer H358 cells



A: Control; B: 50 μmol/L Rg3; C: 100 ng/ml TRAIL; D: 50 μmol/L Rg3+100 ng/ml TRAIL

图2 人参皂苷Rg3联合TRAIL对肺癌H358细胞凋亡的影响

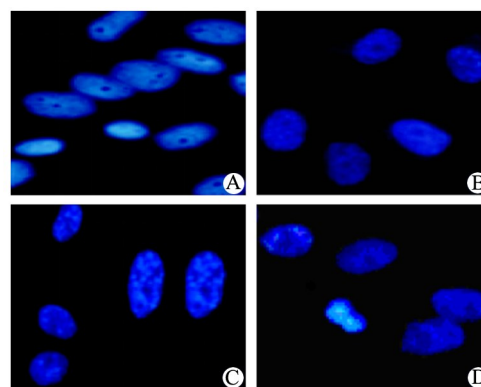
Fig. 2 Effects of ginsenoside Rg3 combined with TRAIL on apoptosis of lung cancer H358 cells

2.3 人参皂苷Rg3联合TRAIL对肺癌H358细胞形态的影响

经DAPI染色结果显示,对照组细胞胞核完整,呈椭圆形,胞核内染色质均匀分布,呈均匀蓝色荧光(图3A);50 ng/ml TRAIL与100 μmol/L人参皂苷Rg3分别单独作用48 h后,部分胞核染色质凝聚、边集(图3B、C);50 ng/ml TRAIL+100 μmol/L人参皂苷Rg3作用48 h后,多数胞核皱缩,染色质凝聚、边集,并出现胞核碎裂等晚期凋亡的典型形态学改变(图3D)。

2.4 人参皂苷Rg3联合TRAIL对肺癌H358细胞DR5的蛋白表达影响

WB检测结果(图4)显示,与单独人参皂苷Rg3或单独TRAIL组比较,人参皂苷Rg3+TRAIL组DR5蛋白的表达明显增强($P<0.05$)。上述结果表明,在人参皂苷Rg3增加肺癌H358细胞对TRAIL敏感性,并促进细胞凋亡的过程中DR起到了关键作用。



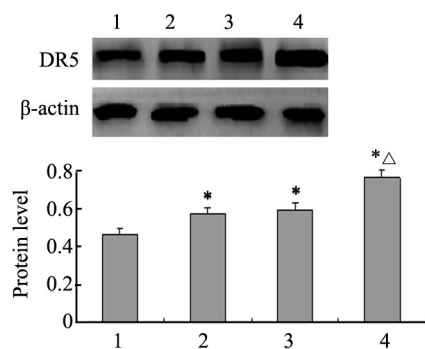
A: Control; B: 100 ng/ml TRAIL; C: 50 μmol/L Rg3;
D: 50 μmol/L Rg3+100 ng/ml TRAIL

图3 TRAIL联合人参皂苷Rg3对肺癌H358细胞形态的影响(×400)

Fig. 3 Effects of TRAIL combined with ginsenoside Rg3 on the morphology of lung cancer H358 cells(×400)

2.5 人参皂苷 Rg3 联合 TRAIL 对肺癌 H358 细胞 caspases 家族表达的调控

WB 实验检测结果(图 5)显示,与人参皂苷 Rg3 单独或 TRAIL 单独作用组比较,人参皂苷 Rg3+TRAIL 组明显增强 caspase-8 的表达(均 $P<0.05$)。上述结果表明,在人参皂苷 Rg3 增加肺癌 H358 细胞对 TRAIL 敏感性,并促进细胞凋亡的过程中 caspase 家族起到了关键作用。



1: Control; 2: 100 ng/ml TRAIL; 3: 50 μmol/L Rg3;
4: 50 μmol/L Rg3+100 ng/ml TRAIL

* $P<0.05$ vs Control group; $^{\Delta}P<0.05$ vs 50 μmol/L Rg3 or 100 ng/ml TRAIL

图 4 TRAIL 联合人参皂苷 Rg3 对 H358 细胞 DR5 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of TRAIL combined with ginsenoside Rg3 on DR5 protein expression in H358 cells

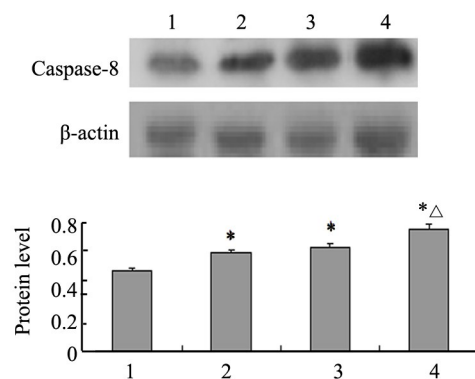
3 讨论

肺癌为常见的恶性肿瘤之一,目前是以手术、放疗、化疗和靶向治疗为主的综合治疗,但上述治疗手段均有其局限性。因此,寻找新的、能有效杀灭肺癌 H358 细胞而对正常细胞毒副作用小的治疗方法成为近年来研究的热点。

本研究发现,TRAIL 与 Rg3 均能够明显抑制肺癌 H358 细胞的增殖,促进其凋亡,并都呈浓度依赖关系,但当两者浓度增加到一定程度时上述作用均不再明显增加。该结果进一步说明 TRAIL 和 Rg3 在肿瘤治疗过程中均存在抵抗性。接下来本研究应用 100 ng/ml TRAIL 和 50 μmol/L Rg3 处理肺癌 H358 细胞,结果发现,当 TRAIL 和人参皂苷 Rg3 联合使用的时候,其杀伤肺癌 H358 细胞的作用最强。本结果初步证明 TRAIL 与 Rg3 在促进肺癌 H358 细胞凋亡的过程中有协同作用,但具体机制不清。

DR5 是 TRAIL 的配体,TRAIL 可以通过与 DR4、DR5 结合来启动凋亡信号,诱导肿瘤细胞凋亡^[8-10]。

本研究发现,当 TRAIL 和人参皂苷 Rg3 联合使用时 DR5 的表达均被明显增强。该研究结果表明,人参皂苷 Rg3 可能是通过增强 DR5 的表达来促进 TRAIL 激活凋亡信号通路活性,进而促进肺癌 H358 细胞的凋亡。



1: Control; 2: 100 ng/ml TRAIL; 3: 50 μmol/L Rg3;
4: 50 μmol/L Rg3+100 ng/ml TRAIL

* $P<0.05$ vs Control group, $^{\Delta}P<0.05$ vs 50 μmol/L Rg3 or 100 ng/ml TRAIL group

图 5 TRAIL 联合人参皂苷 Rg3 对 H358 细胞 caspase-8 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of TRAIL combined with ginsenoside Rg3 on caspase-8 protein expression in H358 cells

Caspases 属于凋亡蛋白酶家族,是凋亡通路的重要组成部分。近年来一些研究^[11-13]报道,很多化疗药物是通过增强 caspases 的表达来提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。本实验结果显示,人参皂苷 Rg3 可以明显上调 caspase-8 的表达,促进 TRAIL 诱导肺癌 H358 细胞凋亡。综合上述研究结果,初步得出结论人参皂苷 Rg3 可以通过增强 DR5、caspase-8 的表达来提高肺癌 H358 细胞对 TRAIL 的敏感性,进而促进肺癌 H358 细胞的凋亡。该研究结果初步证明,人参皂苷 Rg3 与 TRAIL 在诱导肺癌 H358 细胞凋亡的过程中存在明显的协同作用。因此,在肺癌治疗过程中,使用 TRAIL 和人参皂苷 Rg3 联合作用或许是一个有效的治疗策略。

[参考文献]

- [1] KEUPER M, WERNSTED T, SCHERER P E, et al. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) regulates adipocyte metabolism by caspase-mediated cleavage of PPAR gamma[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(1): e474. DOI:10.1038/cddis.2012.212.
- [2] DAI X Y, ZHANG J W, ARFUSO F, et al. Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(6): 760-773. DOI: 10.1177/1535370

- 215579167.
- [3] JAN-BERND N, VERENA J, MUAD M, et al. TNF-related apoptosis inducing ligand in ocular cancers and ocular diabetic complications[J]. *FASEB J*, 2015, 29(7): 3065-3075. DOI: 10.1155 / 2015 / 424019.
- [4] GALLEGU-LLEYDA A, DE MIGUEL D, ANEL A, et al. Lipid nanoparticles decorated with TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) are more cytotoxic than soluble recombinant TRAIL in sarcoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1449. DOI: 10.3390 / ijms19051449.
- [5] KRETZ A, VON KARSTEDT S, HILLENBRAND A, et al. Should we keep walking along the trail for pancreatic cancer treatment? re-visiting TNF-related apoptosis-inducing ligand for anticancer therapy[J]. *Cancers*, 2018, 10(3): 77. DOI:10.3390/cancers10030077.
- [6] LIU T G, HUAN G Y, CUI D D, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice[J/OL]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 250[2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721848/>. DOI: 10.1186/1471-2407-9-250.
- [7] TIAN L L, SHEND C, LI X D, et al. Ginsenoside Rg3 inhibit epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1619-1632 [2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4811485/>. DOI:10.18632/oncotarget.6451.
- [8] WANG Q, CHENQ, ZHU L, et al. JWA regulates TRAIL-induced apoptosis via MARCH8-mediated DR4 ubiquitination in cisplatin-resistant gastric cancer cells[J/OL]. *Oncogenesis*, 2017, 6(7): e353 [2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28671676> DOI:10.1038/oncsis.2017.57.
- [9] MILUTINOVIC S, KASHYAPAK, YANAGI T, et al. Dual agonist surrobody simultaneously activates death receptors DR4 and DR5 to induce cancer cell death[J/OL]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(1): 114-124[2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4707094/>. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-15-0400.
- [10] CAROLI N E, BODVA E L, PHUON G, et al. Modulation of TRAIL resistance in colon carcinoma cells: Different contributions of DR4 and DR5[J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 39[2019-05-26]. <https://www.researchgate.net/publication/51214806>. DOI: 10.1111 / j.1349-7006.2011.02002.x.
- [11] MARCIN K, ALEKSANDRA J, PAULINA N, et al. Small molecule active site directed tools for studying human caspases[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(22): 12546 – 12629. DOI: 10.1021 / acs.chemrev.5b00434.
- [12] DEREK D C, LEWIS L, LUIS P, et al. Learning on the fly: the interplay between caspases and cancer[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5473180[2019-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29854765>. DOI: 10.1155/2018/5473180.
- [13] 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 615 - 619. 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.007.
- [14] MARK L, CHRISTINE H R, HAWKINS K, et al. Executioner caspases and CAD are essential for mutagenesis induced by TRAIL or vincristine [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3062[2019-05-29]. http://med.wanfangdata.com.cn/Paper/Detail/PeriodicalPaper_PM20825380 . DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00914.x.

[收稿日期] 2019-06-15

[修回日期] 2019-08-02

[本文编辑] 王映红