

rubicin-induced inflammation and oxidative stress damage of podocytes by  $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$  pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117:109088.

[15] Li J, Ma L. MiR-142-3p Attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by targeting FBXO3 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. World Neurosurg, 2020, 136:e149.

[16] Kuhn S, Splith K, Ballschuh C, et al. Mononuclear-cell-derived microparticles attenuate endothelial inflammation by transfer of miR-142-3p in a CD39 dependent manner[J]. Purinergic Signal, 2018, 14(4):423.

[17] Guiot J, Cambier M, Boeckx A, et al. Macrophage-derived exosomes attenuate fibrosis in airway epithelial cells through delivery of antifibrotic miR-142-3p[J]. Thorax, 2020, 75(10):870.

[18] Wang Y, Ouyang M, Wang Q, et al. MicroRNA-142-3p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and fibrosis of cardiomyocytes by targeting high mobility group box 1[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(5):1377.

(收稿日期:2020—11—09)

文章编号:1007—4287(2021)12—1836—04

# 人参皂苷诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和自噬

秦 瑞<sup>1</sup>, 纳 钦<sup>2,3</sup>, 曹 璐<sup>1</sup>, 刘俊宝<sup>1</sup>, 边 帅<sup>4</sup>, 冷维春<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学中日联谊医院 妇产科, 吉林 长春 130033; 2. 内蒙古科尔沁右翼中旗蒙医医院, 内蒙古 兴安盟 029400; 3. 科尔沁右翼中旗蒙医研究所, 内蒙古 兴安盟 029400; 4. 长春中医药大学·吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117)

**摘要:**目的 探讨人参皂苷(Ginsenoside)影响宫颈癌 HeLa 细胞自噬与凋亡状况。方法 本研究利用 CCK-8 法考察人参皂苷对细胞活力的作用;借助 Annexin V/FITC-PI 双染法检测人参皂苷对 HeLa 细胞凋亡情况;借助 WB (Western blot) 技术对凋亡相关蛋白的表达水平进行检测;利用 AO 染色检测自噬发生程度。结果 CCK-8 法显示了人参皂苷 Rh2 和 Rg3 显著抑制了宫颈癌细胞的增殖,经细胞流式仪测定发现,对于细胞凋亡, Rh2 与 Rg3 具促进作用,蛋白免疫印迹的结果表明 Rh2 和 Rg3 能够促进宫颈癌细胞凋亡因子的升高,同时吖啶橙染色的结果也表明人参皂苷 Rh2 和 Rg3 能够提高宫颈癌 HeLa 细胞自噬水平。结论 人参皂苷 Rh2 和 Rg3 能够促进宫颈癌细胞凋亡并且调节其自噬。

**关键词:** 人参皂苷; 宫颈癌细胞; 自噬; 凋亡

**中图分类号:** R737. 33 **文献标识码:** A

**Ginsenosides induce apoptosis and autophagy in cervical cancer HeLa cells** QIN Rui, NA Qin, CAO Lu, et al. (Department of Obstetrics and Gynecology, China-Japanese Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of ginsenosides on the apoptosis and autophagy of cervical cancer HeLa cells. **Methods** In this study, the CCK-8 method was used to investigate the effect of ginsenosides on cell viability; with the aid of Annexin V/FITC-PI double staining method, Ginsenoside affected the apoptosis of HeLa cells expand investigation; use WB (Western blot) technology to detect the expression level of apoptosis-related proteins; use AO staining to detect the degree of autophagy. **Results** The CCK-8 method found that ginsenosides Rh2 and Rg3 have a significant inhibitory effect on the proliferation of cervical cancer cells. The results of cell flow cytometry showed that Rh2 and Rg3 could promote cell apoptosis. The results of western blot showed that Rh2 and Rg3 could promote the increase of apoptotic factors in cervical cancer cells, and the results of acridine orange staining also indicate that ginsenosides Rh2 and Rg3 can increase the autophagy level of cervical cancer HeLa cells. **Conclusion** Ginsenosides Rh2 and Rg3 can promote the apoptosis of cervical cancer cells and regulate their autophagy.

**Key words:** ginsenoside; Cervical cancer cells; autophagy; apoptosis

(Chin J Lab Diagn, 2021, 25:1836)

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,早期患者可以通过手术切除病灶获得根治或延缓疾病的发展,晚期患者最常规的治疗手段就是放疗与化疗<sup>[1-4]</sup>。然而,放化疗对于一部分的晚期患者疗效有限<sup>[5]</sup>。流行病学研究已充分明确,生殖器感染 HPV 与宫颈癌的发生和性行为存在联系。若个人任一阶段曾

\* 通讯作者 万方数据

存在多个性伴侣,或性伴侣较多人员的伴侣,则感染 HPV 的风险更大<sup>[6-7]</sup>。自噬与一些生物功能和其他应激反应的整合是由承担调节机制的转录因素决定的<sup>[8]</sup>。人参所含人参单体皂苷的种类在 40 种以上,提取自人参根内的单体皂苷成分以 Rb1、Rc 等为主,在削弱肿瘤生长,减弱肿瘤细胞侵袭性以及加速肿瘤细胞凋亡等方面,Rh2 和 Rg3 发挥着关键作用<sup>[9-12]</sup>。本研究探讨人参皂苷(Ginsenoside)影响宫颈癌 HeLa 细胞自噬与凋亡状况,报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

复苏人类宫颈癌 HeLa 细胞(ATCC,CCL-2),待已融化,马上添加适量(基本为等量)的 DMEM [由 10%FBS(胎牛血清)与青/链霉素(1%)制备]内,先离心,再取出,将上清倒掉,添加适量的 DMEM,再次反复吹打,然后全部转移至已提前加入 5 ml DMEM 的 T25 细胞瓶中,将细胞瓶(内含 HeLa 细胞)移至温度、湿度皆恒定的培养箱内培养。倒置显微镜下观察,待瓶底细胞 80%左右,开始传代与铺板。

### 1.2 主要仪器与试剂

酶标仪(型号:Infinite 200PRO,品牌:瑞士帝肯);FlowSight® 成像流式细胞仪(美国马萨诸塞州伯灵顿的默克密理博公司);硝酸纤维素膜(沃特曼,Maidstone,英国);抗 Bcl-2 抗体,抗 Bax 抗体(CST 公司,USA);Ibriht 成像系统(赛默飞世尔科技),抗 Tubulin 抗体(安诺伦公司,北京);人参皂苷 Rh2,人参皂苷 Rg3(成都曼思特生物科技有限公司);DMSO(碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 CCK-8 法检测细胞存活率

将 HeLa 细胞用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤两次,向 96 孔板内接种细胞,各孔的接种量皆为  $2 \times 10^3$ ,第 2 d,待细胞贴壁,将上清培养液清除掉,再添加培养基,完成 DMSO 对照组、人参皂苷 Rh2、人参皂苷 Rg3 实验组的设置,这 2 组皆设置 4 个复孔,各孔体积皆为 0.2 ml,经过 1 d 培养,向各孔添加 CCK-8 试剂,加量皆为 0.02 ml,再移至培养箱(37℃)内,进行 45 min 遮光孵育,借助酶标仪,测定各孔 OD 450 nm 值,同时对每组细胞存活率进行计算。

### 1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将 HeLa 细胞以密度为  $8 \times 10^4$ /孔接种于 6 孔板中,培养过夜,分别加入 DMSO、Rh2、Rg3 再继续培养 24 h,胰酶消化,将处理过的细胞用碘化丙锭

(PI)和膜联蛋白 V-FITC 双重染色。使用 FlowSight® 成像流式细胞仪分析样品。使用 IDEAS Application V6.1 分析软件分析结果。

### 1.5 蛋白质印迹分析

通过离心收集处理的细胞,重悬于裂解缓冲液中,煮沸 15 min。用 Bradford 测定试剂盒测定总蛋白浓度。然后通过 12%SDS-PAGE(每泳道 8  $\mu$ g)分离蛋白质,然后将其转移到硝酸纤维素膜上。于室温环境中,把膜浸于干脱脂牛奶(5%)内,接受 0.5 h 的封闭处理。再通过 PBST(PBS tween-20)实施洗涤,之后对膜和一抗(1:1 000)于 4℃温度下实施 12 h 的孵育处理,再和二抗(1:1 000)于室温中实施 60 min 的孵育处理。最后,通过化学发光底物将蛋白质信号可视化,并使用 Ibriht 成像系统进行成像,使用 ImageJ 软件进行光密度分析。

### 1.6 吖啶橙(AO)染色法

向 12 孔板内接种细胞,同时培养 12 h,之后分别添加 DMSO、Rh2、Rg3 接着进行 1 d 培养。通过 PBS 对细胞实施 1 遍洗涤处理,于室温环境中,通过甲醛(4%)固定,计时 10 min,通过 PBS 对细胞实施洗涤,添加 AO 染色液(0.01 mg/mL),再进行 20 min 的遮光孵育处理。然后用 AO 在黑暗中染色 30 min,在 488 nm 的荧光显微镜下观察并成像。

### 1.7 统计学处理

全部数据为 3 次平行实验结果,且由“平均值±标准差”描述。统计学方法采用 Repeated Measures ANOVA 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人参皂苷影响宫颈癌 HeLa 细胞增殖状况

如图 1 所示(显示部分皂苷),在正常培养条件下,作用时间 24 h,HeLa 细胞 Rb1、Rh2 和 Rg3 的细胞毒性筛选发现,人参皂苷 Rh2 在浓度为 45  $\mu$ M 和 Rg3 浓度为 75  $\mu$ M 时,细胞活力显著下降。

### 2.2 人参皂苷对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响

如图 2 所示,与对照组相比较,宫颈癌 HeLa 细胞经过 Rh2 和 Rg3 处理后的凋亡率分别为 32.07% 和 27.13%,都显著高于 DMSO 组的 2.08%。经由蛋白免疫印迹可知,对宫颈癌 HeLa 细胞完成 Rh2、Rg3 干预,细胞内 Bax 凋亡相关蛋白含量大幅增多,Bcl-2 凋亡相关蛋白含量则大幅减少。

### 2.3 人参皂苷影响宫颈癌 HeLa 细胞自噬状况

在人参皂苷处理后,许多 AVOs 以剂量依赖性方式出现。也就是当自噬水平较低时,主要观察到绿色荧光,当自噬水平升高,则绿色荧光减弱,红色

荧光增强。如图 3 所示,结果表明,人参皂苷 Rh2 和 Rg3 都能显著提高宫颈癌细胞的自噬水平。

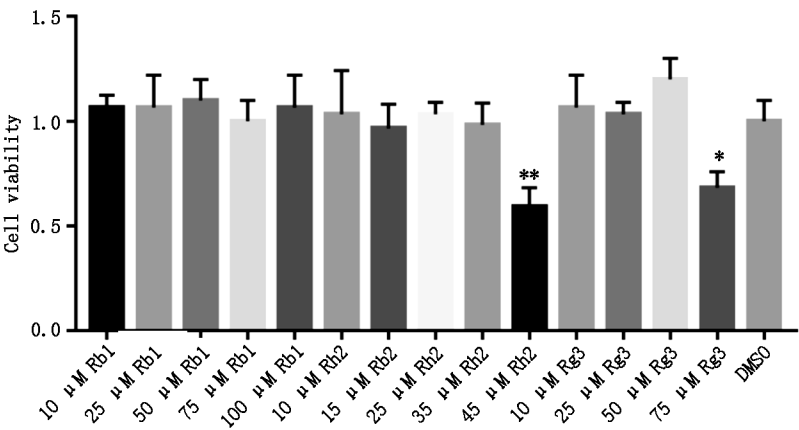


图 1 人参皂苷对宫颈癌细胞增殖的影响

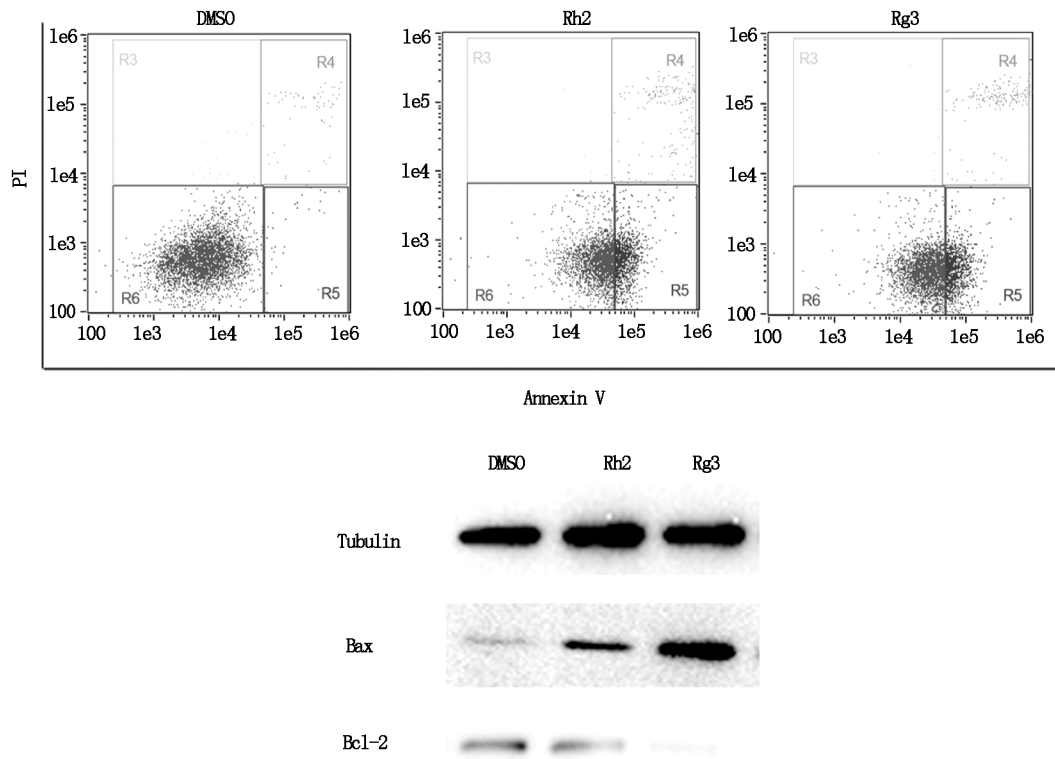


图 2 人参皂苷促进宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及相关凋亡蛋白的表达

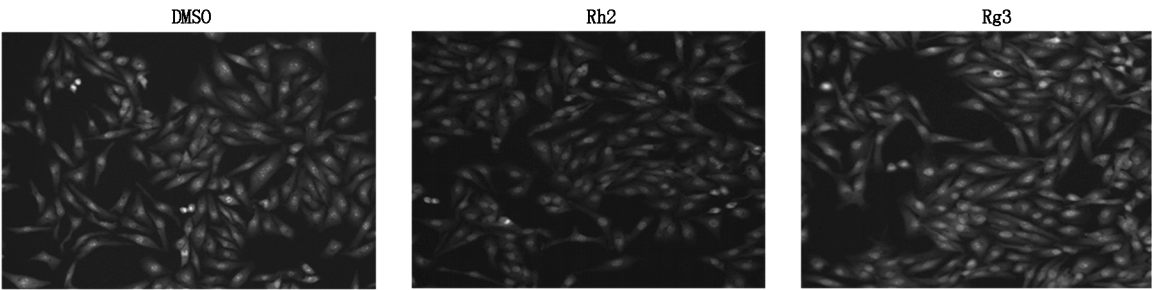


图 3 人参皂苷对宫颈癌 HeLa 细胞自噬的影响

3 讨论

自噬抑制属于一类具创新性的细胞调控机制，自噬同肿瘤发展存在紧密联系，对确定肿瘤新的治疗靶点和寻找新的抗肿瘤药物具有重要意义。中药可否经由调控肿瘤细胞的自噬途径，实现对肿瘤的有效抑制效果，为今后抗肿瘤研究的趋势。

对于包括子宫颈癌在内的多种癌症，介入治疗是一种副作用少、并发症少的新疗法。人参皂苷在癌症<sup>[13-15]</sup>的预防和治疗中发挥着重要作用。可通过介入治疗与其他化疗药物联合使用，避免口腔和肠道的降解。与口服相比，局部应用可减少化疗药的用量<sup>[16-17]</sup>。

本研究通过筛选多种人参皂苷，证实 Rh2 以及 Rg3 皆可以显著削弱宫颈癌细胞的增殖，使细胞活力降低，并且促进细胞凋亡，同时提高了宫颈癌细胞的凋亡蛋白表达水平。总之，Rh2 与 Rg3 这两种人参皂苷可对细胞增殖施以有效抑制，对其凋亡进行促进，期间可将细胞自噬激活。而人参皂苷对宫颈癌细胞的凋亡同自噬间的联系与确切机制依然有待开展深入的研究和探索。

参考文献：

[1]Pandey RA,Karmacharya E. Cervical cancer screening behavior and associated factors among women of Ugrachandi Nala,Kavre, Nepal[J]. Eur J Med Res,2017,22(1):32.

[2]Vora C,Gupta S. Targeted therapy in cervical cancer[J]. ESMO Open 2018,3:e000462.

[3]Mesafint Z,Berhane Y,Desalegn D. Health seeking behavior of patients diagnosed with cervical cancer in addis ababa,ethiopia [J]. Ethiop J Heal Sci,2018,28:111.

[4]Tsikouras P,Zervoudis S,Manav B,et al. Cervical cancer:screening,diagnosis and staging[J]. J Buon,2016,21(2):320.

[5]Liang LD,He T,Du TW,et al. Ginsenoside-Rg5 induces apoptosis and DNA damage in human cervical cancer cells[J]. Mol Med

Rep,2015,11:940.

[6]Gkretsi V,Stylianopoulos T. Cell adhesion and matrix stiffness: coordinating cancer cell invasion and metastasis[J]. Front Oncol, 2018,8:145.

[7]Lee KH,Lo HL,Tang WC,et al. A gene expression signature-based approach reveals the mechanisms of action of the Chinese herbal medicine berberine[J]. Sci Rep,2014,4:6394.

[8]姜广利,马静静,何胜悦. 双氢青蒿素通过调控细胞自噬性死亡增强宫颈癌细胞的化疗敏感性[J]. 中国免疫学杂志,2019,35(10): 1213.

[9]Kim YJ,Jeon JN,Jang MG,et al. Ginsenoside profiles and related gene expression during foliation in Panax ginseng Meyer[J]. Ginseng Res,2014,38:66.

[10]Levy JMM,Towers CG,Thorburn A. Targeting autophagy in cancer[J]. Nature Reviews Cancer,2017,17:528.

[11]Son KJ,Choi KR,Lee SJ,et al. Immunogenic cell death induced by ginsenoside Rg3: significance in dendritic cell-based anti-tumor immunotherapy[J]. Immune Netw,2016,16:75.

[12]Zhou Y,Zheng X,Lu J,et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 inhibits the warburg effect via modulating DNMT3A/MiR-532-3p/HK2 pathway in ovarian cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem,2018, 45:2548.

[13]李军鹏. 靶向 STAT3-Bcl2 通路促进宫颈癌细胞凋亡和自噬实验研究[D]. 广州:南方医科大学,2020.

[14]杨子霖,王志莲. 调控 TGF-β1/Smad4 通路对宫颈癌 Si Ha 细胞自噬基因 p62 的影响[J]. 医学研究杂志,2020,49(11):82.

[15]周 莉. Rosoloactone 通过内质网应激/自噬途径诱导人宫颈癌细胞凋亡的机制研究[D]. 吉林大学,2019.

[16]Wang SG,Mu N,Sun HY. Effect of interventional therapy on the expression of survivin mRNA in cervical cancer[J]. Anticancer Res,2017,37:4707.

[17]Kim DG,Jung KH, Lee DG,et al. 20(S)-Ginsenoside Rg3 is a novel inhibitor of autophagy and sensitizes hepatocellular carcinoma to doxorubicin[J]. Oncotarget,2014,5:4438.

(收稿日期:2021-03-13)