

文章编号:1674-6309(2022)04-0343-06

· 论著 ·

人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠抗肿瘤作用

王柯^{1,2,3}, 陈函^{1,2,3}, 胡志强⁴, 马康^{1,2,3}, 汪静^{1,2,3}

(1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 宁夏特色中医药协同创新中心, 银川 750004; 3. 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室, 银川 750004; 4. 宁夏医科大学总医院肿瘤医院, 银川 750004)

摘要:目的 观察人参皂苷 Rg3 联合 GP(吉西他滨联合顺铂)对 Lewis 肺癌小鼠抗肿瘤作用。方法 建立 Lewis 肺癌小鼠移植瘤模型,评估人参皂苷 Rg3 联合 GP 的抗肿瘤作用;组织学切片法检测荷瘤小鼠肝、肾、脾和肿瘤的病理变化;免疫组化法检测肿瘤内微血管密度(MVD)、瘤体血小板表面活化标记物(CD62P)和 Nrf2 信号通路关键蛋白的表达。结果 给药后,与对照组比较,GP 组和联合组小鼠肿瘤质量均减轻(P 均 <0.05)。联合组小鼠的抑瘤率达 84.4%,GP 组为 79.7%,人参皂苷 Rg3 组为 22.8%;组织病理学变化结果显示,人参皂苷 Rg3 可以促进肿瘤细胞凋亡,并且对 GP 所致的肝、肾、脾的损伤具有改善作用。GP 组小鼠给药后体质量持续下降;联合组小鼠体质量呈先下降后增加趋势。免疫组化结果显示,对照组小鼠肿瘤组织微血管大量增生,而人参皂苷 Rg3 组、GP 组和联合组小鼠肿瘤 MVD 均较对照组减少(P 均 <0.05);与对照组相比,各治疗组 CD62P 蛋白表达均出现不同程度降低(P 均 <0.05);并且人参皂苷 Rg3 联合 GP 化疗可下调 Nrf2 信号通路蛋白(Nrf2、NQO1、GSTA1 与 HO-1)的表达。结论 人参皂苷 Rg3 与 GP 联用后可增强其对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤生长及肿瘤新生血管生成的抑制作用,其抑瘤作用可能与干预 Nrf2 信号通路和 CD62P 的表达相关;且人参皂苷 Rg3 与 GP 联用后可起到增效减毒作用。

关键词:人参皂苷 Rg3;吉西他滨联合顺铂;Lewis 肺癌;Nrf2 信号通路;增效减毒

中图分类号:R734.2

文献标识码:A

DOI:10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2022.04.004

近年来,癌症在我国发病率逐年上升,尤其肺癌的发病率和病死率均位居榜首^[1]。以吉西他滨联合顺铂(GP)为主的联合化疗方案是治疗肺癌的主要手段之一^[2],但 GP 在杀伤肿瘤细胞的同时,会损伤免疫细胞,且会伴随一些严重的肝、肾和骨髓抑制毒性。因此,探究可防治肿瘤且减轻这些毒副反应的辅助治疗药物,对提高患者生存质量并延长生存期具有重要的临床意义。人参皂苷 Rg3 是一种人参二醇类四环三萜皂苷,具有较好的抗癌、抗转移作用^[3]。研究^[4-5]表明,人参皂苷 Rg3 能显著提高小鼠的免疫功能;且人参皂苷 Rg3 可抑制肿瘤细胞的增殖,并将肿瘤细胞阻滞于 G2 期,可有效抑制肿瘤细胞有丝分裂前期蛋白质和 ATP 的合成。目前,人参皂苷 Rg3 与 GP 联合应用对 Lewis 肺癌小鼠的抗肿瘤作用以及是否可发挥增效减毒作用的研究较少。基于此,本研究通过建立 Lewis 肺癌小鼠移植瘤模型,以评估

人参皂苷 Rg3 联合 GP 的抗肿瘤作用及增效减毒作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(LLC)购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,并由宁夏特色中医药协同创新中心保存。

1.2 主要试剂

人参皂苷 Rg3 购于上海源叶生物科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$,批号:Z10J10X90072);顺铂购于上海源叶生物科技有限公司(批号:B12J10L79601);吉西他滨购于上海源叶生物科技有限公司(批号:T21J8T40183);MVD 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司(批号:AH03095376);CD62P 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司(批号:AH11156358);Nrf2(批号:00051701)、NQO1(批号:00056400)、GSTA1(批号:00056400)和 HO-1(批号:00063937)抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;兔二步法检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司(批号:2004B1124)。

1.3 方法

1.3.1 造模与实验分组

取 32 只 5~6 周龄雄性

收稿日期:2021-03-24

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划一般项目(2019BEG03040)

作者简介:王柯,男,在读硕士研究生。E-mail:1043296556@qq.com

通信作者:汪静,女,博士,副教授,硕士研究生导师。

E-mail:jingwang_2018@163.com

C57BL/6 小鼠适应性喂养 3 d 后,于小鼠皮下注射状态良好的 LLC 细胞(密度为 5×10^6 个/mL),每只接种 0.2 mL,建立小鼠 Lewis 肺癌模型。待肿瘤体积增长至约 50 mm^3 时按照平均瘤体随机分为 4 组($n=8$)。对照组:每日给予等量生理盐水;GP 组:吉西他滨第 1、8 天腹腔注射,给药剂量($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、0.2 mL),顺铂第 1、6、8 天腹腔注射,给药剂量($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、0.2 mL);人参皂苷 Rg3 组:每日灌胃 1 次,连续给药 12 d,给药剂量($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、0.2 mL);联合组(人参皂苷 Rg3 联合 GP):人参皂苷 Rg3 每日灌胃,连续给药 12 d,给药剂量($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、0.2 mL),吉西他滨与顺铂给药方案与 GP 组相同。治疗期间,隔天监测小鼠体质量和肿瘤的长径 a 及短径 b ,肿瘤体积(mm^3)= $a \times b^2/2$;治疗结束后,断颈处死小鼠,剥瘤及肝、脾、肾。肿瘤生长抑制率= $[(\text{对照组肿瘤质量}-\text{实验各组肿瘤质量})/\text{对照组肿瘤质量}] \times 100\%$ 。

1.3.2 器官组织和肿瘤组织的 HE 染色 各组小鼠器官(肝、脾与肾组织)和肿瘤组织用中性福尔马林固定 24 h,流水冲洗后,石蜡包埋切片,常规 HE 染色,在光镜下观察器官和肿瘤组织病理学改变。

1.3.3 免疫组化法检测肿瘤组织微血管密度(MVD)、CD62P 和 Nrf2 信号通路的表达 瘤体剥离后,切取标本,组织块经 10%多聚甲醛固定后,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片。常规脱蜡、水化,高温修复抗原,免疫组化画圈笔圈住组织,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,孵育后,分别滴加 MVD、CD62P、Nrf2、NQO1、GSTA1 和 HO-1 抗体(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。PBS 冲洗,滴加反应增强液,PBS 冲洗,滴加增强酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察,拍照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠一般情况的影响

接种 LLC 细胞 3 d 后,各组小鼠皮下均可触及绿豆大小结节,表明 Lewis 肺癌荷瘤小鼠造模成功。给药后,随着实验时间的延长,GP 组小

鼠体质量持续下降,进食量及饮水量相对减少,对外界刺激反应性下降,自由活动少,毛发稀疏。对照组、人参皂苷 Rg3 组及联合组上述症状相对较轻,并且小鼠体质量均出现不同程度增长,联合组小鼠体质量呈先下降后增长趋势,人参皂苷 Rg3 组小鼠体质量增长幅度最为明显,见图 1。

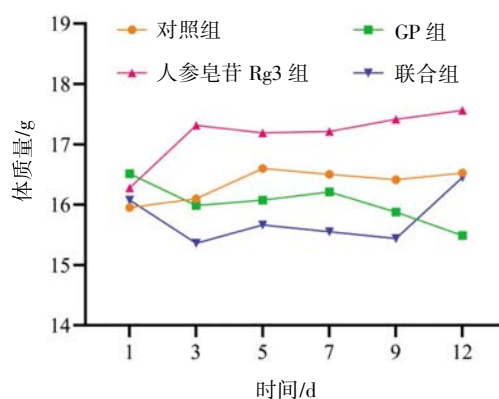


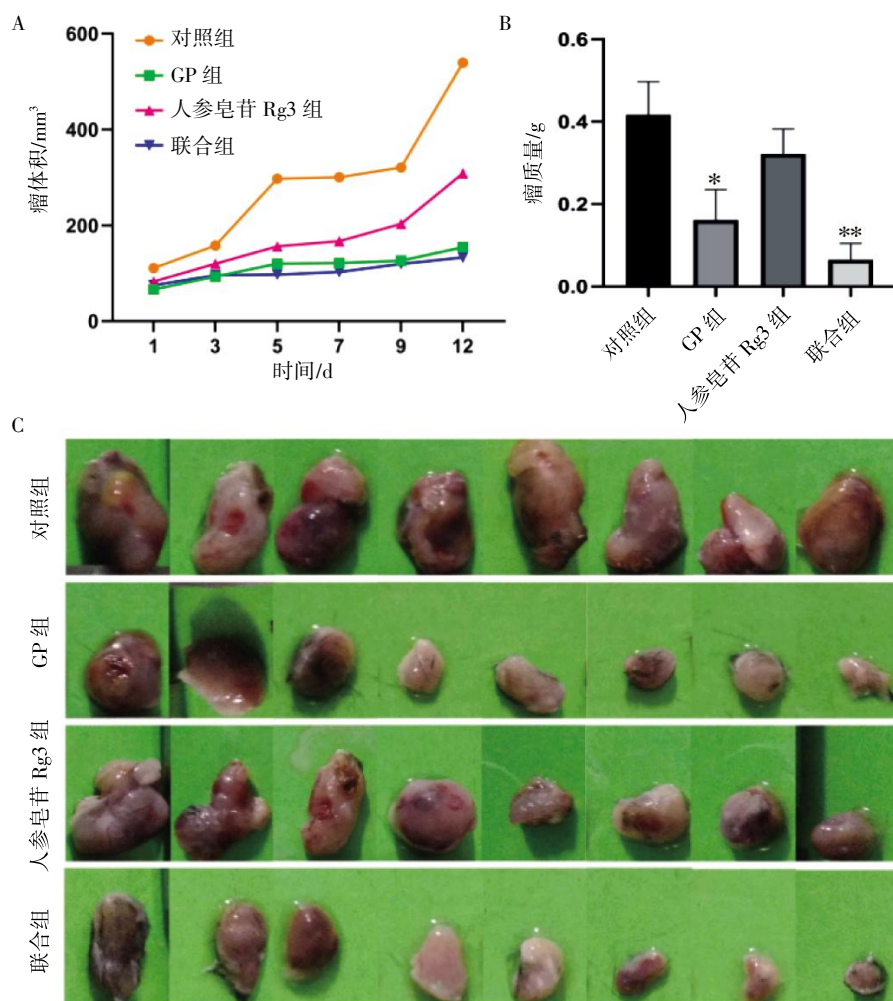
图 1 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠体质量的影响

2.2 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠实体瘤的抑制作用

随着实验时间的延长,对照组小鼠肿瘤体积持续快速增长。与对照组相比,人参皂苷 Rg3 组小鼠瘤体体积增长缓慢,GP 组和联合组小鼠瘤体体积增长接近停滞;与对照组相比,GP 组和联合组小鼠瘤质量均降低(P 均 <0.05)。联合组小鼠的肿瘤生长抑制率达 84.4%,GP 组为 79.7%,人参皂苷 Rg3 组小鼠为 22.8%;与对照组相比,其余 3 组小鼠的肿瘤相对较小,见图 2。

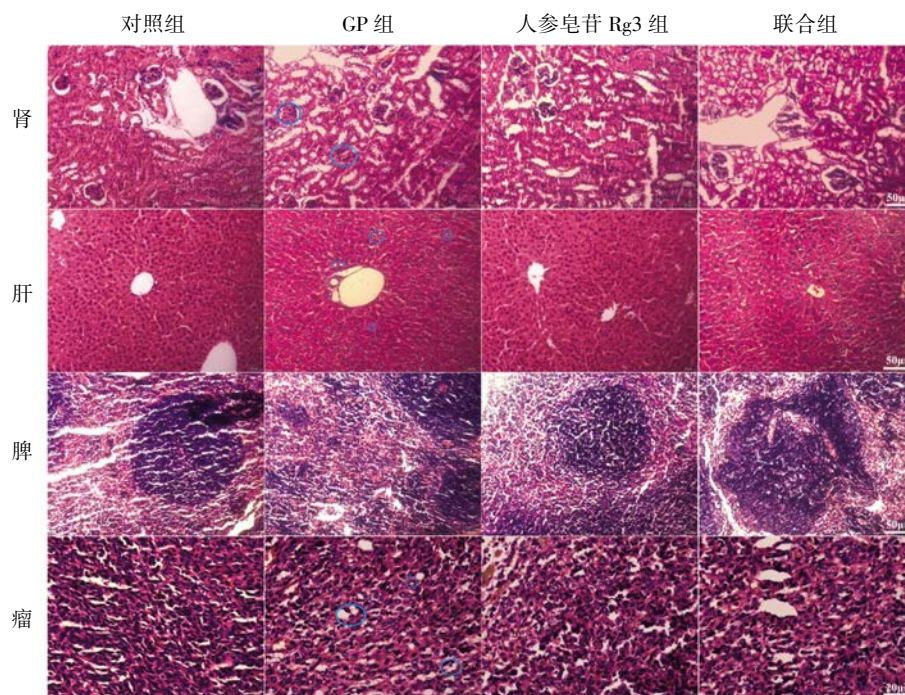
2.3 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠肝、肾、脾和肿瘤病理变化的影响

由图 3 所示,肝组织中,对照组和人参皂苷 Rg3 组小鼠肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列,肝细胞形态正常,细胞核无改变;GP 组小鼠肝细胞排列不均匀,肝细胞出现大量空泡状脂滴,细胞核发生固缩;联合组小鼠肝细胞脂滴和核固缩减少,病变程度改善。肾组织中,对照组和人参皂苷 Rg3 组小鼠可见肾小管、肾小球结构清楚,形态和染色基本正常;GP 组小鼠肾小球管腔变窄并有少量坏死,肾小管间质毛细血管扩张充血;联合组小鼠肾小球结构正常,肾小管间质毛细血管扩张充血,相对于 GP 组病变程度改善。脾组织中,对照组和人参皂苷 Rg3 组的小鼠脾组织实质内结构分明,蓝色骨髓、红色红髓结构清楚,脾细胞排列规则,染色均匀;而 GP 组小鼠脾组织学



A.各组小鼠肿瘤体积随时间的变化;B.各组小鼠肿瘤质量比较;C.各组小鼠肿瘤实体变化;与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠实体瘤的抑制作用



GP 组各组织 HE 染色图片中蓝色圆圈分别为:异常肾小球、异常肝细胞及凋亡肿瘤细胞。

图3 各组小鼠肾、肝、脾($\times 20$)和肿瘤($\times 40$)的 HE 染色图

结构紊乱,红髓、白髓分布不清,细胞排列不规则;联合组小鼠脾组织实质结构得以修复,红髓和白髓重新形成,脾细胞分布较规则。肿瘤组织中,与对照组相比,其他3组小鼠肿瘤细胞均出现不同程度的凋亡,联合组小鼠细胞凋亡最为明显,GP组次之,人参皂苷 Rg3 组较低。

2.4 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 CD62P 和 MVD 的影响

MVD 和 CD62P 主要表达于肿瘤细胞的胞质及胞膜中,阳性染色为棕黄色。对照组小鼠肿瘤组织微血管大量增生,与对照组相比,人参皂苷 Rg3 组、GP 组和联合组小鼠肿瘤 MVD 均减少(P 均 <0.05)。与对照组相比,各治疗组 CD62P 蛋白表达均降低(P 均 <0.05),见表 1、图 4。

表 1 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 CD62P 和 MVD 的影响

组别	视野数	MVD/个	CD62P/%
对照组	3	21.0±1.15	23.13±0.47
GP 组	3	11.0±0.88**	15.43±0.23**
人参皂苷 Rg3 组	3	13.3±1.20**	20.45±0.30*
联合组	3	7.3±1.20**	12.55±0.21**

与对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2.5 人参皂苷 Rg3 联合 GP 对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中 Nrf2 信号通路的影响

如图 5 所示,Nrf2、NQO1、GSTA1 和 HO-1 主要表达于肿瘤细胞的胞质及胞膜中,阳性染色为棕黄色。与对照组相比,GP 组上述各蛋白表达均上调,而联合组和人参皂苷 Rg3 组上述各蛋白表达均下调。与 GP 组相比,人参皂苷 Rg3 组和联合组 Nrf2、NQO1、GSTA1 和 HO-1 蛋白表达均下调。

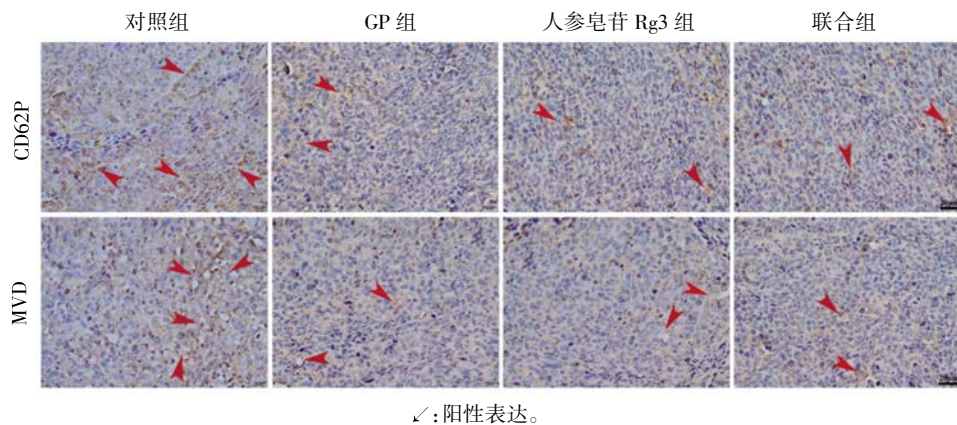


图 4 CD62P 和 MVD 免疫组化结果(×40)

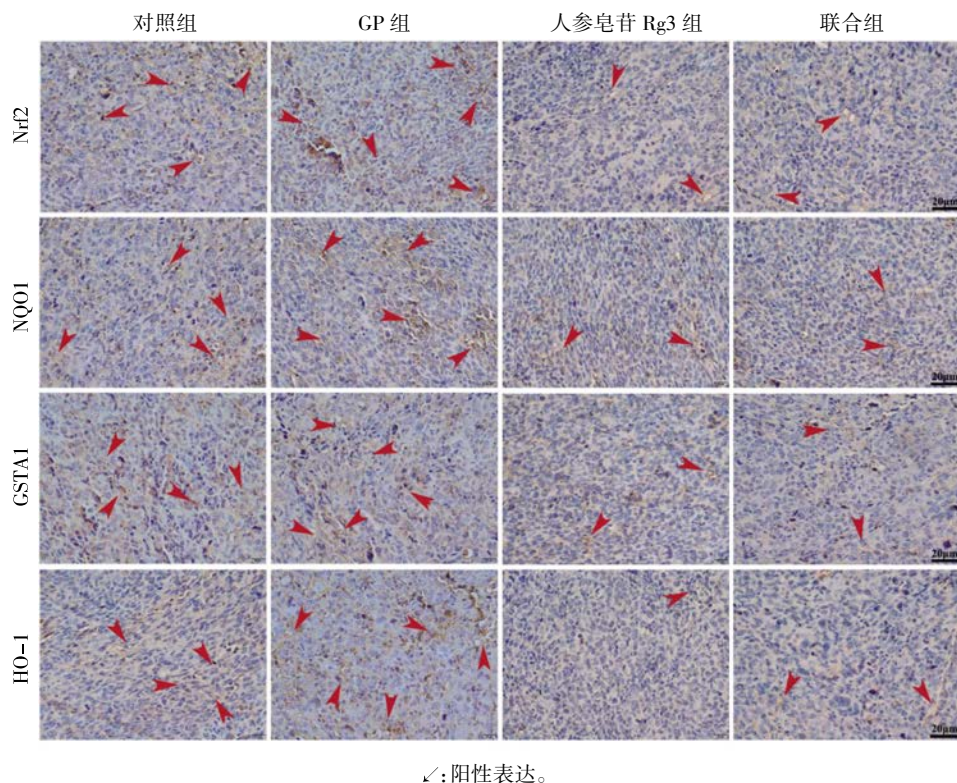


图 5 各组小鼠瘤组织中 Nrf2 信号通路表达量比较(×40)

3 讨论

目前手术切除是治疗肺癌最快、最有效的方法,然而术后要接受放疗进行巩固治疗,以GP为主的化疗方案带来的毒副反应如肝、肾毒性和骨髓抑制等贯穿整个化疗过程。因此,中药复方及其单体成分联合GP改善肺癌患者术后生存质量目前已成为抗癌研究的热点。

人参皂苷为人参主要活性成分,其单体按照苷元骨架类型分为三大类,人参皂苷Rg3为其中一类。已证实人参皂苷Rg3对肿瘤生长具有抑制作用,其机制是通过各种信号通路影响各种蛋白的表达去诱导肿瘤细胞凋亡、分化,抑制肿瘤细胞转移,增强宿主免疫功能等机制而发挥抗肿瘤作用^[6-7]。本研究结果显示,GP、人参皂苷Rg3联合GP对Lewis肺癌小鼠实体瘤均有抑制作用,其中以人参皂苷Rg3与GP联合组抗肿瘤作用最明显,表明人参皂苷Rg3能提高GP对肿瘤细胞的杀伤能力;且通过各组小鼠体质量变化和各组组织HE染色发现,人参皂苷Rg3对GP所致的肝、肾、脾的损伤具有改善作用。

研究^[8]显示,肿瘤的增殖和转移与血管新生密切相关,当肿瘤组织生长达到1~3 mm后,需要充足的血管供应,因此向肿瘤组织提供氧分与营养并运输代谢物保证其正常生长,新血管的生成是必要条件^[7]。MVD是目前用以衡量肿瘤新生血管程度的有效指标,肿瘤组织中MVD的增高预示瘤体增长速度加快、转移可能性增大。CD62P是位于血小板、血管内皮细胞膜上的糖蛋白,其主要配体是PSGL-1和CD24,主要介导肿瘤细胞与血管内皮、血小板的黏附,并在肿瘤的发展、转移中起重要作用^[9]。本研究中,各给药组MVD均低于对照组,且各治疗组CD62P的表达均低于对照组,与有关研究^[10-14]结果一致,表明人参皂苷Rg3联合GP可有效抑制肿瘤新生血管生成。

Nrf2作为调控抗氧化的主要因子,为肿瘤细胞中的稳定或异常表达创造了有利于肿瘤细胞生存的环境。当给予肿瘤细胞顺铂后,会触发细胞内的氧化应激,诱导肿瘤细胞凋亡。与此同时,胞内活性氧升高,Nrf2会被激活进入细胞核并激活相关的Ⅱ相解毒酶,如奎宁氧化还原酶(NQO1)、谷胱甘肽转移酶(GSTA1)和血红素加氧酶(HO-1),从而削弱化疗药的“杀”细胞作用,保护细胞生存。在本研究中,GP组Nrf2、NQO1、GSTA1和HO-1蛋白表达均较对照组上调,人参

皂苷Rg3组与联合组上述各蛋白表达均下调,表明人参皂苷Rg3联合GP可干预Nrf2信号通路发挥抗肿瘤作用。

综上所述,人参皂苷Rg3与GP联合后可增强其对Lewis肺癌小鼠肿瘤生长与肿瘤新生血管生成的抑制作用,且其抑瘤作用可能与干预Nrf2信号通路和CD62P的表达相关,且人参皂苷Rg3与GP联用后可起到增效减毒作用。

参考文献:

- [1] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2019,28(1):1-11.
- [2] 李向欣,穆新林,李璐. 吉西他滨注射剂联合顺铂注射剂治疗非小细胞肺癌患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(11):1446-1449.
- [3] 于雪妮,冯小刚,张建民,等. 人参化学成分与药理作用研究新进展[J]. 人参研究,2019,31(1):47-51.
- [4] 郑厚胜,郑斯文,王英平,等. 人参皂苷Rg3对环磷酸腺苷致免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中成药,2021,43(11):3202-3206.
- [5] 张翔,叶宝东,陈丹,等. 人参皂苷Rg3抗肿瘤机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2013,31(2):328-330.
- [6] Shi ZY,Zeng JZ,Wong AST. Chemical structures and pharmacological profiles of ginseng saponins[J]. Molecules,2019,24(13):2443.
- [7] 陈若冰,袁慎俊,刘丹,等. 人参皂苷Rg3抗肿瘤作用机制的研究新进展[J]. 生命的化学,2017,37(4):561-565.
- [8] 李明月,范恒,胡德胜. 促进大肠癌血管新生相关因素研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2020,28(11):435-442.
- [9] 史伟. CD62P及其配体在肿瘤转移中的作用[J]. 山西中医学院学报,2008,9(4):51-53.
- [10] 尹学哲,朴龙,金爱花,等. 草苈蓉提取物对小鼠H₂₂肝癌移植瘤血管生成的抑制作用[J]. 食品研究与开发,2016,37(14):1-4.
- [11] Mei XF,Shu J,Huang RZ,et al. Expression of VEGF, CD73 and their relationship with clinical pathology, microvessel density, and prognosis in renal cell carcinoma[J]. Transl Androl Urol,2020,9(3):1366-1373.
- [12] 徐宏伟,徐小艳,王娜,等. 乳腺浸润性导管癌中EZH2、VEGF和MVD的表达及与临床病理学特征的关系[J]. 实用医药杂志,2019,36(10):923-927,961.
- [13] 刘丹,李杨,王雪林,等. 黄芪多糖(APS)及联合顺

铂(DDP)抑制小鼠 Lewis 肺癌复发瘤生长的机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(12):1105-1110.

状态的变化研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(40):183-184.

(责任编辑:刘 瑛)

[14] 肖云,沈漪萍,王翠玉,等. 食管癌患者血小板活化

Anti-tumor Effect of Ginsenoside Rg3 Combined with GP on Lewis Lung Cancer in Mouse

WANG Ke^{1,2,3}, CHEN Han^{1,2,3}, HU Zhiqiang⁴, MA Kang^{1,2,3}, WANG Jing^{1,2,3}

(1. Department of Pharmacology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Ningxia Collaborative Innovation Center of Regional Characteristic Traditional Chinese Medicine, Yinchuan 750004, China; 3. Key Laboratory of Ningxia Ethnomedicine Modernization, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China; 4. Oncology Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To observe the anti-tumor effect of Ginsenoside Rg3 combined with GP (gemcitabine and cisplatin) on Lewis lung cancer bearing mice. **Methods** Lewis lung cancer model in mice was established to evaluate the anti-tumor effect of Ginsenoside Rg3 combined with GP. The pathological changes of liver, kidney, spleen and tumor were detected by histological section technology. The expression of microvascular density(MVD), CD62P and key proteins of Nrf2 signaling pathway were detected by immunohistochemistry.

Results After administration, compared with the control group, the tumor weight of GP group and combination group was significantly lower (P all < 0.05). In terms of tumor inhibition rate was 84.4%, 79.7% and 22.8% in the combination group, the GP group and the Ginsenoside Rg3 group, respectively. Moreover, the results of histopathological changes showed that Ginsenoside Rg3 could promote tumor cells apoptosis and improve the damage of liver, kidney and spleen caused by GP. In terms of body weight, it continued to decrease after administration in the GP group and the body weight of the mice in combination group showed a trend of decreasing firstly and then increasing. The results of immunohistochemistry showed that microvessels were greatly proliferated in the tumor tissues of the control mice, while MVD was significantly reduced (P all < 0.05) in Ginsenoside Rg3 group, GP group and combination group compared. The protein expression of CD62P in each treatment group appeared to be decreased to various degrees (P all < 0.05). And Ginsenoside Rg3 combined with GP could decrease the protein expression of Nrf2 signaling pathway (Nrf2, NQO1, GSTA1 and HO-1).

Conclusion Ginsenoside Rg3 combined with GP enhanced effect of inhibiting tumor growth and angiogenesis in Lewis lung cancer mice. And its tumor suppressive effect may be associated with intervening Nrf2 signaling pathway and CD62P expression. Moreover, Ginsenoside Rg3 combined with GP chemotherapy could exert a synergistic and attenuating effect in tumor treatment.

Key words: Ginsenoside Rg3; gemcitabine and cisplatin; Lewis lung cancer; Nrf2 signal pathway; synergism and attenuation