

- regulatory axis promotes lung squamous metastasis via CDR1-mediated regulation of golgi trafficking [J]. Cancer Res, 2020, 80(22):4972~4985.
- [9] Li L, Sun D Q, Li X P, et al. Identification of key circRNAs in Non-small cell lung cancer [J]. Am Med Sci, 2021, 361(1): 98~105.
- [10] Jin X D, Yuan L Y, Liu B T, et al. Integrated analysis of circRNA-miRNA-mRNA network reveals potential prognostic biomarkers for radiotherapies with X-rays and carbon ions in non-small cell lung cancer [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(21):1373.
- [11] Jin Y R, Su Z J, Sheng H, et al. Circ_0086720 knockdown strengthens the radiosensitivity of non-small cell lung cancer via mediating the miR-375/SPIN1 axis [J]. Neoplasma, 2021, 68(1):96~107.
- [12] Huang M F, Li T Q, Wang Q, et al. Silencing circPVT1 enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer by sponging microRNA-1208 [J]. Cancer Biomark, 2021, 31(3):263~279.
- [13] Shen X, Wang D L, Chen X, et al. Propofol inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis by regulating HOST2/JAK2/STAT3 signaling pathway in ovarian cancer cells [J]. Cytotechnology, 2021, 73(2):243~252.
- [14] Zhang B. Guizhi Fuling pills inhibit the proliferation, migration and invasion of human cutaneous malignant melanoma cells by regulating the molecular axis of LncRNA TPT1-AS1/miR-671-5p [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2020, 66(11):148~154.
- [15] Ma C, Nie Z K, Guo H M, et al. MiR-671-5p plays a promising role in restraining osteosarcoma cell characteristics through targeting TUFT1 [J]. Biochem Mol Toxicol, 2020, 34(7):e22490.

【文章编号】1006-6233(2022)01-0013-05

人参皂苷 Rg3 调控 Dickkopf 相关蛋白 3 对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

胡珊珊, 王少文, 蒋 磊

(安徽省第二人民医院, 安徽 合肥 230000)

【摘 要】目的:探究人参皂苷 Rg3 对肝癌细胞增殖的影响及其作用机制。**方法:**以人肝癌细胞系 HepG2 为研究对象,分为对照组(Control)、人参皂苷 Rg3 组(G-Rg3)、人参皂苷 Rg3+Dickkopf 相关蛋白 3 无关片段组(G-Rg3+DKK3-NC)以及人参皂苷 Rg3+Dickkopf 相关蛋白 siRNA 组(G-Rg3+DKK3-siRNA)。其中 G-Rg3 组细胞给予 G-Rg3 (40mg/L) 干预 48h; G-Rg3+DKK3-NC 组细胞转染 DKK3-NC 24h, 后 G-Rg3 干预 48h; G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞转染 DKK3-siRNA 后, G-Rg3 干预 48h; Control 组细胞正常培养。MTT 法检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质免疫印迹法检测 DKK3、Wnt、 β -连环蛋白(β -catenin)表达。**结果:**与 Control 组相比, G-Rg3 组细胞凋亡指数显著升高($P<0.01$)、细胞增殖显著降低($P<0.01$)、DKK3 表达显著升高($P<0.01$), Wnt 和 β -catenin 表达均显著降低($P<0.01$);与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞凋亡指数显著降低($P<0.01$)、细胞增殖显著增加($P<0.01$)、DKK3 表达显著降低($P<0.01$), Wnt 和 β -catenin 表达均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**G-Rg3 能够抑制肝癌细胞增殖,促进凋亡,其机制与促进 DKK3 表达,抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导相关。

【关键词】 肝 癌; 人参皂苷 Rg3; Dickkopf 相关蛋白 3; 凋 亡; 增 殖

【文献标识码】 A **【doi】**10.3969/j.issn.1006-6233.2022.01.03

The Effect of Ginsenoside Rg3 Regulateing Dickkopf-Related Protein 3 on the Proliferation and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells

HU Shanshan, WANG Shaowen, JIANG Lei

(The Second People's Hospital of Anhui Province, Anhui Hefei 230000, China)

【Abstract】Objective: To explore the effect of ginsenoside Rg3 on the proliferation of liver cancer cells

【基金项目】2018 年度安徽高校自然科学研究重点项目, (编号: KJ2018C0287)

and its mechanism. **Methods:** The human liver cancer cell line Hep G2 was used as the research subject which was divided into control group (Control), ginsenoside Rg3 group (G-Rg3), ginsenoside Rg3+Dickkopf-related protein 3 irrelevant fragment group (G-Rg3+DKK3-NC), and ginsenoside Rg3+Dickkopf-related protein siRNA group (G-Rg3+DKK3-siRNA). G-Rg3 group cells were given G-Rg3 (40 mg/L) intervention for 48 h; 24h after G-Rg3+DKK3-NC group cells were transfected with DKK3-NC, G-Rg3 intervention was conducted 48 h; after G-Rg3+DKK3-siRNA group cells were transfected, G-Rg3 intervention was conducted 48 h; cells in the control group were cultured normally. MTT method was used to detect cell proliferation; flow cytometry was used to detect cell apoptosis; Western blotting was used to detect the expression of DKK3, Wnt, and β -catenin. **Results:** Compared with the control group, the apoptosis index of G-Rg3 group was significantly increased ($P<0.01$), cell proliferation was significantly decreased ($P<0.01$), DKK3 expression was significantly increased ($P<0.01$), Wnt and β -catenin expression were significantly decreased ($P<0.01$); compared with the G-Rg3 group, the apoptosis index in the G-Rg3+DKK3-siRNA group was significantly reduced ($P<0.01$), cell proliferation was significantly increased ($P<0.01$), DKK3 expression significantly decreased ($P<0.01$), and the expression of Wnt and β -catenin increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** G-Rg3 can inhibit the proliferation of liver cancer cells and promote apoptosis. The mechanism is related to the promotion of DKK3 expression and inhibition of Wnt/ β -catenin signal transduction.

【Key words】 Liver cancer; Ginsenoside Rg3; Dickkopf-related protein 3; Apoptosis; Proliferation

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率、预后差以及病死率高等特点。最新研究显示,我国肝癌患者的发病人数每年超过30万,严重的危害患者生命健康^[1]。既往研究证实,手术切除仍然是治疗早期肝癌的最佳方式,但是由于肝癌患者早期临床症状表现不明显,导致多数患者发现时已经为中晚期,85%以上的患者无法进行手术切除治疗^[2]。因此,寻找有效的抗肿瘤药物对于肝癌治疗一直是研究的热点。人参皂苷 Rg3(Ginsenoside Rg3, G-Rg3)是人参皂苷中有效的抗肿瘤活性成分之一,能够抑制肺癌、胃癌、肝癌等细胞增殖,对患者具有良好的治疗作用^[3,4]。但是目前有关 G-Rg3 对肝癌细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制尚不完全清楚。Dickkopf 相关蛋白 3(Dickkopf-related protein3, DKK3)是属于 Dickkopf 家族成员之一,研究发现,在肝癌患者癌组织中 DKK3 表达降低,过表达 DKK3 能够促进肝癌细胞 HepG2 凋亡^[5]。以上研究表明,DKK3 在肝癌患者疾病进展中发挥重要作用,但是有关 DKK3 在肝癌细胞增殖和凋亡中的调控机制以及药物干预研究较少。因此,本实验拟通过体外培养人肝癌细胞系 HepG2,观察 G-Rg3 能否通过调控 DKK3 表达,从而抑制肝癌细胞增殖,促进细胞凋亡,以期 G-Rg3 临床治疗肝癌提供新的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂:人肝癌细胞系 HepG2(中国科学院

上海细胞生物研究所);人参皂苷 Rg3(上海钰博生物科技有限公司,批号:14197-60-5);Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒(美国 Sigma 公司,批号:4030ES20);噻唑兰(3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2-yl)-4-methylphenyltetrazolium bromide, MTT)检测试剂盒(江苏碧云天生物技术公司,批号:C0009S);细胞裂解液、胰酶、蛋白酶抑制剂、蛋白 marker、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、牛血清白蛋白(Bovine albumin, BSA)粉末、一抗稀释液、二抗稀释液、显影液检测试剂盒、羊抗兔 IgG 抗体(批号:A0239)、羊抗鼠 IgG 抗体(批号:A0192)、DKK3 抗体(批号:ab36898)、Wnt 抗体(批号:ab8805)、 β -连环蛋白(β -catenin)抗体(批号:ab38449)、 β -actin 抗体(批号:AF5001)购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 仪器: TWK-FST32 型细胞匀浆仪(武汉泰普拓公司);Micro17R 型高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);GPJ9-TS100-F 型倒置荧光显微镜(日本尼康(Nikon)公司);FC 型全自动多功能酶标检测仪(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);1658033 型电泳仪(美国伯乐 Bio-Rad 公司);ChemiDoc XRS+成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 肝癌细胞培养与分组: HepG2 细胞采用 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的杜尔贝科的改良鹰培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)并

置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱内培养,贴壁生长,待生长融合度达80~90%时,倾去培养基,磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffer solution, PBS)润洗2次,采用0.25%的胰蛋白酶消化3 min至细胞呈现卵圆形,10% FBS的DMEM细胞培养基终止消化,进行传代处理。实验分为:对照组(Control)、人参皂苷Rg3组(G-Rg3)、人参皂苷Rg3+Dickkopf相关蛋白3无关片段组(G-Rg3+DKK3-NC)以及人参皂苷Rg3+Dickkopf相关蛋白siRNA组(G-Rg3+DKK3-siRNA)。其中G-Rg3组细胞给予G-Rg3(40mg/L)干预48h;G-Rg3+DKK3-NC组细胞转染DKK3-NC 24h后,G-Rg3干预48h;G-Rg3+DKK3-siRNA组细胞转染DKK3-siRNA后,G-Rg3干预48h;Control组细胞正常培养。

1.4 MTT法测定肝癌细胞活力:将消化后的HepG2细胞按照96孔板密度为:1×10⁴/孔接种,按照细胞实验分组进行相关处理,每组设置6个复孔,重复实验6次,G-Rg3干预处理48h,每孔加入MTT溶液10μL(5mg/mL)继续培养4h,终止培养,弃去细胞上清,每孔加入150μL的二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)震荡10min,酶标仪设定波长为570nm检测各孔的吸光度值,以光密度(optical density, OD)值反应细胞的增殖活力。

1.5 流式细胞术检测肝癌细胞凋亡:细胞转染DKK3-NC或是DKK3-siRNA 24h后,G-Rg3干预处理48h,收集各组细胞,PBS润洗3遍,离心后倾去细胞液,细胞重悬并将浓度调整为1×10⁵/mL。按照Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明书操作,在488 nm处,分别激发525 nm和620 nm带孔滤波器,检测FITC和碘化丙啶(propidium iodide, PI)荧光,从而得到4组肝癌细胞的凋亡情况。

1.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测DKK3、Wnt和β-catenin表达:收集各组细胞,4℃条件下裂解30 min,期间每隔5 min震荡1次;BCA法测定蛋白质浓度;凝胶电泳;湿转转膜;上样;用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,孵育对应抗体DKK3(1:1000)、Wnt抗体(1:1000)、β-catenin抗体(1:1000)以及β-actin抗体(1:2000),4℃过夜,孵育对应的羊抗兔IgG抗体或者羊抗鼠IgG抗体(1:5000)1~2h;摇床摇晃并加TPBS洗涤3次,5min/次,然后加入显影液,显影并拍照。DKK3、Wnt和β-catenin蛋白表达水平以目的蛋白条带灰度值与β-actin灰度值相比反映。

1.7 统计学分析:采用SPSS20.0软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,各组间计量资料采用独立

样本t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 G-Rg3对肝癌细胞增殖的影响:MTT检测显示,与Control组相比,G-Rg3组细胞活力明显从0.65±0.14下降至0.41±0.12(P<0.01)。与G-Rg3组相比,G-Rg3+DKK3-siRNA组细胞活力明显从0.41±0.12升高至0.58±0.10(P<0.05),见图1。

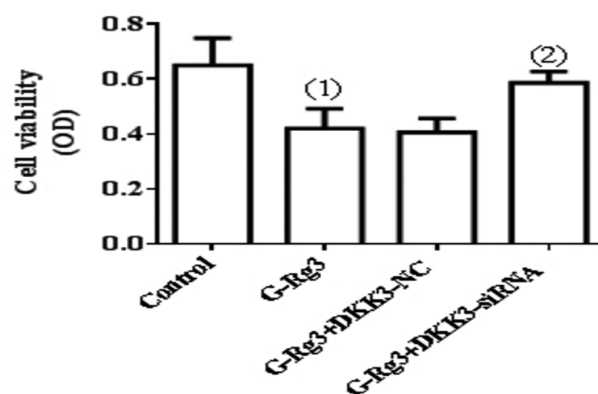


图1 G-Rg3对肝癌细胞增殖的影响

注:与Control组相比,①P<0.01;与G-Rg3组相比,②P<0.05

2.2 G-Rg3对肝癌细胞凋亡的影响:流式细胞术检测显示,与Control组相比,G-Rg3组细胞凋亡指数明显从(5.6±1.3)%升高至(44.3±7.5)% (P<0.01)。与G-Rg3组相比,G-Rg3+DKK3-siRNA组细胞凋亡指数明显从(44.3±7.5)%降低至(15.2±6.3)% (P<0.01),见图2。

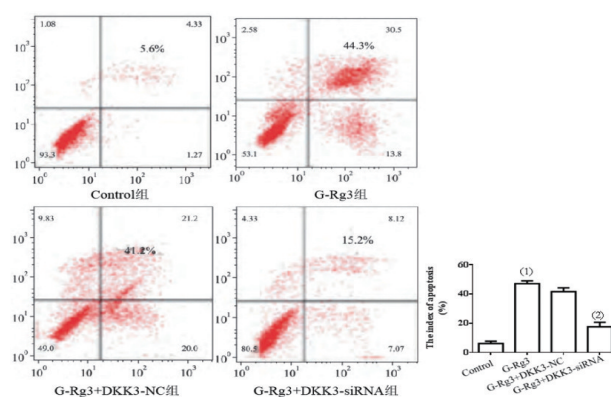


图2 G-Rg3对肝癌细胞凋亡的影响

注:与Control组相比,①P<0.01;与G-Rg3组相比,②P<0.01

2.3 G-Rg3对肝癌细胞DKK3表达的影响:与Control组相比,G-Rg3组细胞DKK3蛋白相对表达量明显从1.00±0.10升高至2.35±0.28(P<0.01)。与G-Rg3组

相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞 DKK3 蛋白相对表达量明显从 2.35 ± 0.28 降低至 1.14 ± 0.15 ($P < 0.01$), 见图 3。

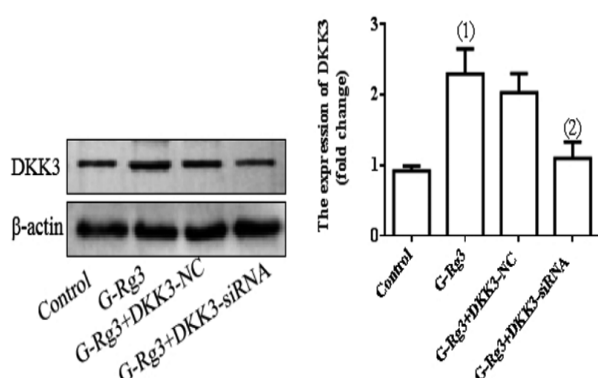


图 3 G-Rg3 对肝癌细胞 DKK3 表达的影响

注:与 Control 组相比,① $P < 0.01$;与 G-Rg3 组相比,② $P < 0.01$

01

2.4 G-Rg3 对肝癌细胞 Wnt/ β -catenin 表达的影响:与 Control 组相比, G-Rg3 组细胞 Wnt/ β -catenin 蛋白相对表达量明显从 1.00 ± 0.09 和 1.0 ± 0.14 分别降低至 0.35 ± 0.06 和 0.38 ± 0.05 ($P < 0.01$)。与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞 Wnt/ β -catenin 蛋白相对表达量明显从 0.35 ± 0.06 和 0.38 ± 0.05 分别升高至 0.91 ± 0.14 和 0.75 ± 0.23 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 4。

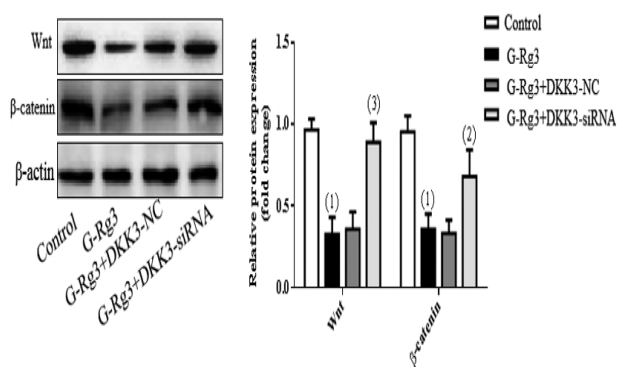


图 4 G-Rg3 对肝癌细胞 Wnt/ β -catenin 表达的影响

注:与 Control 组相比,① $P < 0.01$;与 G-Rg3 组相比,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$

05,③ $P < 0.01$

3 讨 论

G-Rg3 是从红参中提取的四环三萜皂苷活性单体。既往研究显示, G-Rg3 能够通过抑制多种肿瘤细胞增殖、迁移, 促进肿瘤细胞凋亡等发挥抗肿瘤作用^[6]。但是目前有关 G-Rg3 对肝癌细胞增殖和凋亡的作用机制尚不完全清楚。因此, 本研究拟采用体外

培养人肝癌细胞系 HepG2, 探究 G-Rg3 对细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制。

本研究首先观察 G-Rg3 对肝癌细胞增殖和凋亡的影响。MTT 与流式细胞术实验结果显示, 与 Control 组相比, G-Rg3 组 HepG2 细胞增殖显著降低, 细胞凋亡指数明显升高, 表明 G-Rg3 能够抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡, 与以往研究结果一致。DKK3 表达与多种肿瘤发展密切相关, DKK3 能够充当抑制剂作用, 发挥抗肿瘤活性^[7]。为此, 本实验推测, G-Rg3 可能是通过促进 DKK3 表达, 从而发挥抑制肝癌细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。结果显示, 与 Control 组相比, G-Rg3 组肝癌细胞增殖显著降低, 凋亡显著升高。本研究结果再一次证实, DKK3 表达与 G-Rg3 抑制肝癌细胞增殖、促进细胞凋亡相关。以往研究发现, DKK3 表达下调是子宫内膜宫颈癌预后的不良标志^[8], 那么 DKK3 是否是 G-Rg3 抑制肝癌细胞增殖、促进凋亡的关键蛋白呢? 本研究通过细胞转染 DKK3 siRNA 进一步观察 G-Rg3 对肝癌细胞增殖和凋亡的作用。Western blot 结果显示, 与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞 DKK3 表达显著降低, DKK3 NC 组无显著变化, 表明转染 DKK3 siRNA 成功。MTT 检测显示, 与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞增殖显著升高。流式细胞术检测显示, 与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞凋亡指数显著降低。以上研究表明, G-Rg3 能够通过促进 DKK3 表达, 从而抑制肝癌细胞增殖, 促进细胞凋亡。Wnt/ β -catenin 信号通路是调控细胞凋亡、增殖以及细胞外基质稳定的重要途径, 在调控肿瘤细胞凋亡过程中发挥重要作用^[9]。DKK3 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键调节蛋白, 被认为是 Wnt 信号传导的抑制因子^[10]。在结直肠癌细胞系 HCT116 中 DKK3 表达下调, 过表达 DKK3 能够抑制 Wnt/ β -catenin 活化促进肿瘤细胞凋亡^[11]。为此, 本实验通过调控 DKK3 观察 G-Rg3 对 Wnt/ β -catenin 信号相关蛋白表达的影响。结果显示, 与 Control 组相比, G-Rg3 组细胞 Wnt/ β -catenin 表达均显著降低。与 G-Rg3 组相比, G-Rg3+DKK3-siRNA 组细胞 Wnt/ β -catenin 表达均显著增加。本研究结果与既往研究结果一致。

综上所述, G-Rg3 能够抑制肝癌细胞增殖, 促进凋亡, 其机制与促进 DKK3 表达, 抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导相关。

【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] 刘海亮,严茂林,白燕南,等.手术治疗肝癌伴肝静脉癌栓的疗效分析[J].中华普通外科杂志,2019,4(8):652~655.
- [3] Li B, Qu G. Inhibition of the hypoxia-induced factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression through ginsenoside Rg3 in human gastric cancer cells[J]. Cancer Res Ther, 2019; 15(7): 1642~1646.
- [4] Sun MY, Song YN, Zhang M, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits the migration and invasion of liver cancer cells by increasing the protein expression of ARHGAP9[J]. Oncol Lett, 2019, 17(1): 965~973.
- [5] 李侨,丁丽娟,蔡姗姗.甲基化寡核苷酸灭活 DKK3 基因对肝癌细胞增殖的影响[J].实用预防医学,2018,25(10):1258~1260.
- [6] 戴依懿,汪佳兵.人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 增殖、迁移及凋亡的影响[J].江苏医药,2020,46(12):1189~1193.
- [7] 毕春燕,王保莲,王文翔,等.DKK3 下调 IL-32 β 对宫颈癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(23):5052~5057.
- [8] Dellinger TH, Planutis K, Jandial DD, et al. Expression of the Wnt antagonist Dickkopf-3 is associated with prognostic clinicopathologic characteristics and impairs proliferation and invasion in endometrial cancer[J]. Gynecol Oncol, 2012, 126(2): 259~267.
- [9] 李卿明,张胜亮,徐庭华,等.STEAP1 对乳腺癌细胞增殖、侵袭迁移及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J].中国免疫学杂志,2020,36(21):2628~2634.
- [10] Ferrari N, Ranftl R, Chicherova I, et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 130.
- [11] 刘桂元,张永慧,庞毅.WNT 信号抑制因子 DKK3 基因对结直肠癌细胞系 HCT116 迁移与侵袭的影响[J].基础医学与临床,2019,39(10):1437~1443.

【文章编号】1006-6233(2022)01-0017-05

I 型大麻素受体对脊髓损伤小鼠和小胶质细胞活化的影响

安 康, 马正良

(南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

【摘 要】目的:探讨 I 型大麻素受体(CB1R)对脊髓损伤小鼠和小胶质细胞活化的影响。**方法:**36 只 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠,随机分为对照组、模型组和药物组,通过改良 Allen's 法,构建小鼠脊髓损伤模型。分别于术后第 1 天、第 7 天和第 14 天,进行行为学评价。术后第 14 天处死小鼠,Western blotting 法检测脊髓组织髓鞘碱性蛋白(MBP)、脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)蛋白表达。酶联免疫吸附法测定小鼠血清 IL-6、IL-17 和 TNF- α 含量。免疫荧光双染检测脊髓组织钙离子结合调节因子(IBA)-1 和 ED-1 阳性细胞表达。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠术后 BMS 评分和斜坡倾斜度明显降低,血清 IL-6、IL-17 和 TNF- α 含量、脊髓组织 MBP、BDNF 和 NGF 蛋白含量及 IBA1/ED1 双阳性细胞均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,药物组小鼠术后 BMS 评分、斜坡倾斜度、脊髓组织 MBP、BDNF 和 NGF 蛋白含量均明显升高,血清 IL-6、IL-17 和 TNF- α 含量以及脊髓组织 IBA1/ED1 双阳性细胞均明显降低($P<0.05$)。**结论:**CB1R 通过抑制小胶质细胞活化和炎症反应,降低脊髓损伤。

【关键词】 I 型大麻素受体; 脊髓损伤; 小胶质细胞

【文献标识码】 A **【doi】**10.3969/j.issn.1006-6233.2022.01.04

Protective Effect and Mechanism of Cannabinoid 1 Receptor on and Microglia Activation in Mice with Spinal Cord Injury

AN Kang, MA Zhengliang

(Dum Tower Hospital Affiliated to Medical College Nanjing University, Jiangsu Nanjing 210008, China)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect and mechanism of cannabinoid 1 receptor

【基金项目】国家自然科学基金项目,(编号:81901136)

【通讯作者】马正良