

本文引用：潘天龙, 潘骏. 人参皂苷Rh2通过调控GSK-3 β /Wnt双信号通路影响骨肉瘤细胞增殖和凋亡[J]. 温州医科大学学报, 2022, 52(9): 712-717.

人参皂苷Rh2通过调控GSK-3 β /Wnt双信号通路影响骨肉瘤细胞增殖和凋亡

潘天龙, 潘骏

温州医科大学附属第二医院育英儿童医院 骨科, 浙江 温州 325027

[摘要] 目的: 探讨人参皂苷Rh2 (Rh2) 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响, 并进一步研究Rh2在骨肉瘤中抗肿瘤作用的机制。方法: 分别以不同浓度的Rh2处理骨肉瘤细胞, 用MTT法检测骨肉瘤细胞活性的变化; 用基质凝胶 (Matrigel) 侵袭和孔膜法 (Transwell) 迁移实验检测骨肉瘤细胞的侵袭和迁移能力的变化; 用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒及流式细胞仪检测骨肉瘤细胞的凋亡变化; 用Western blot法检测细胞侵袭、凋亡相关蛋白的表达情况。结果: 骨肉瘤细胞经过不同浓度的Rh2处理后, MTT实验结果表明Rh2在一定浓度范围内可以显著抑制骨肉瘤细胞的生长 ($P < 0.05$)。Matrigel侵袭和Transwell迁移实验结果表明Rh2可以有效抑制骨肉瘤细胞的侵袭与迁移 ($P < 0.05$)。Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒及流式细胞仪检测结果表明, Rh2可以促进骨肉瘤细胞的凋亡反应 ($P < 0.05$)。Western blot实验结果则显示Rh2可以上调Bax、E-cadherin蛋白的表达, 并抑制Bcl-2、PARP、MMP2、MMP9蛋白的表达。Rh2还可以通过激活GSK-3 β 并抑制 β -catenin、Cyclin D1和C-myc相关蛋白来达到调控骨肉瘤细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭反应的作用。结论: Rh2可以抑制骨肉瘤细胞的增殖并诱导其凋亡, 这种作用可能是通过激活GSK-3 β 并抑制Wnt/ β -catenin信号通路来实现的。

[关键词] 人参皂苷Rh2; 骨肉瘤; 细胞凋亡; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞侵袭; GSK-3 β /Wnt

[中图分类号] R816.8 DOI: 10.3969/j.issn.2095-9400.2022.09.004

The effect of Ginsenoside Rh2 on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells through regulating GSK-3 β /Wnt dual signaling pathway PAN Tianlong, PAN Jun. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital & Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

Abstract: **Objective:** To investigate the effect of Ginsenoside Rh2 (Rh2) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of osteosarcoma cells, and to further explore the specific antitumor mechanism of Rh2. **Methods:** Osteosarcoma cells were treated with different concentrations of Rh2. MTT assay was used to detect the activity of osteosarcoma cells. Matrigel invasion and Transwell migration assay were used to detect the changes in invasion and migration ability of osteosarcoma cells. Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit and flow cytometry were used to detect the apoptosis of osteosarcoma cells. The expression of related proteins was detected by Western blot. **Results:** After osteosarcoma cells were treated with different concentrations of Rh2. The results of MTT test showed that Rh2 could significantly inhibit the growth of osteosarcoma cells in a certain concentration range. Matrigel invasion and Transwell migration experiments showed that Rh2 could effectively inhibit the invasion and migration of osteosarcoma cells. In addition, annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit and flow cytometry showed that Rh2 could effectively improve the apoptosis of osteosarcoma cells. Western blot showed that Rh2 could up regulate the expression of Bax and E-cadherin, and inhibit the expression of Bcl-2, PARP, MMP-2 and MMP-9. Rh2 could also regulate the proliferation, apoptosis, migration and invasion of osteosarcoma cells via activating GSK-3 β protein and inhibiting β -Catenin, Cyclin D1 and C-myc related proteins. **Conclusion:** Ginsenoside Rh2 can inhibit the proliferation and induce apoptosis of osteosarcoma cells, in which the activation of GSK-3 β and the inhibition of Wnt/ β -Catenin signal pathway may play a role.

Key words: Ginsenoside Rh2; osteosarcoma; apoptosis; proliferation; migration; invasiveness; GSK-3 β /Wnt

收稿日期: 2022-03-17

基金项目: 温州市基础性科研项目 (Y20180068)。

作者简介: 潘天龙, 住院医师, Email: 785289389@qq.com。

通信作者: 潘骏, 主任医师, Email: panjun@wmu.edu.cn。

骨肉瘤是最常见的原发性骨肿瘤之一,由于其恶性程度高,侵袭性强,易发生转移,病情进展十分迅速,导致患者的长期生存率不高^[1]。因为骨肉瘤细胞对放疗不敏感,所以化疗是骨肉瘤的主要临床治疗方法。寻找一种更加有效且不良反应较小的新型化疗药物则成为了骨肉瘤治疗的主要方向。相关研究表明Wnt/ β -catenin信号通路对肿瘤的发生和发展具有一定的调控作用^[2-3]。人参皂苷Rh2是人参皂苷中主要活性物质的水解成分之一,具有多种药理活性,其对肺癌、乳腺癌及黑色素瘤等肿瘤细胞均具有较强的抗肿瘤作用^[4-5]。然而,对于Rh2在骨肉瘤细胞中具体的抗肿瘤作用的相关研究报导相对较少。因此,本研究旨在探讨Rh2是否可以通过调节GSK-3 β /Wnt双信号通路抑制骨肉瘤细胞的增殖、侵袭、迁移并诱导其凋亡,为骨肉瘤的临床治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 试剂 人参皂苷Rh2购于北京Solarbio科技有限公司;MMP2、MMP9、E-cadherin、Bcl-2、Bax、PARP均购自美国Cell Signaling Technology公司;Cyclin D1、GSK-3 β 、 β -catenin、C-myc均购自美国Abcam Technology公司;胎牛血清、DMEM基本培养基等均购于美国Gibco公司。

1.2 细胞培养 人骨肉瘤细胞株U2OS和MG63购自上海基因化学有限公司。U2OS和MG63骨肉瘤细胞均在含有10%的胎牛血清,1%青、链霉素双抗的DMEM培养基中培养,培养箱中的条件为37℃,5% CO₂。

1.3 细胞活性检测 用不同浓度的Rh2(0、35、70和100 μ mol/L)处理U2OS和MG63骨肉瘤细胞24和48 h,随后按照说明书使用MTT检测试剂盒检测骨肉瘤细胞活性的变化。

1.4 蛋白质印迹(Western blot)法检测相关蛋白的表达 用不同浓度的Rh2(0、35和70 μ mol/L)处理U2OS和MG63骨肉瘤细胞24 h后提取总蛋白,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度。随后进行SDS-PAGE凝胶电泳、PVDF膜转膜,5% BSA封闭液封闭2 h,随后加入一抗(MMP2、MMP9、E-cadherin、Bcl-2、Bax、PARP、Cyclin D1、GSK-3 β 、 β -catenin、C-myc;抗体比例1:1 000)并在4℃摇床冰箱孵育过夜。次日使用相应的二抗(抗体比例1:3 000)室温孵育2 h,随后加入ECL显影液并在化学发光显像仪上曝光,收集图像并定量分析。

1.5 骨肉瘤细胞的迁移和侵袭实验 在细胞迁移实验中将U2OS和MG63骨肉瘤细胞(5×10^4)接种在无血清培养基中的Transwell平板的上孔中,下孔添加600 μ L培养基(含10% FBS)。U2OS和MG63骨肉瘤细胞在37℃含5% CO₂的增湿培养箱中培养过夜。用含有Rh2(分别为0、35和70 μ mol/L)的新鲜培养基替换上孔中的培养基,并再培养24 h。随后使用结晶紫溶液对迁移的细胞进行染色处理并收集图像分析。在细胞侵袭实验中用预冷的培养基将Matrigel试剂按1:10进行稀释。随后将50 μ L Matrigel稀释液加入Transwell平板的上孔中,在细胞培养箱中培养30 min,聚合成凝胶。随后在培养孔中添加无血清培养基(每个培养孔50 μ L)并在37℃的CO₂培养箱中再培养30 min。将剩余液体从培养孔中吸出,之后的程序与上述细胞迁移实验相同。

1.6 骨肉瘤细胞的凋亡实验 将U2OS和MG63细胞(3×10^5)接种在6孔细胞培养板中,并在37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜。次日,用Rh2(0、35和70 μ mol/L)处理骨肉瘤细胞24 h。然后,按照CA1020-100T试剂说明(北京Solarbio科技有限公司),使用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒收集细胞并通过流式细胞仪检测骨肉瘤细胞的凋亡情况。

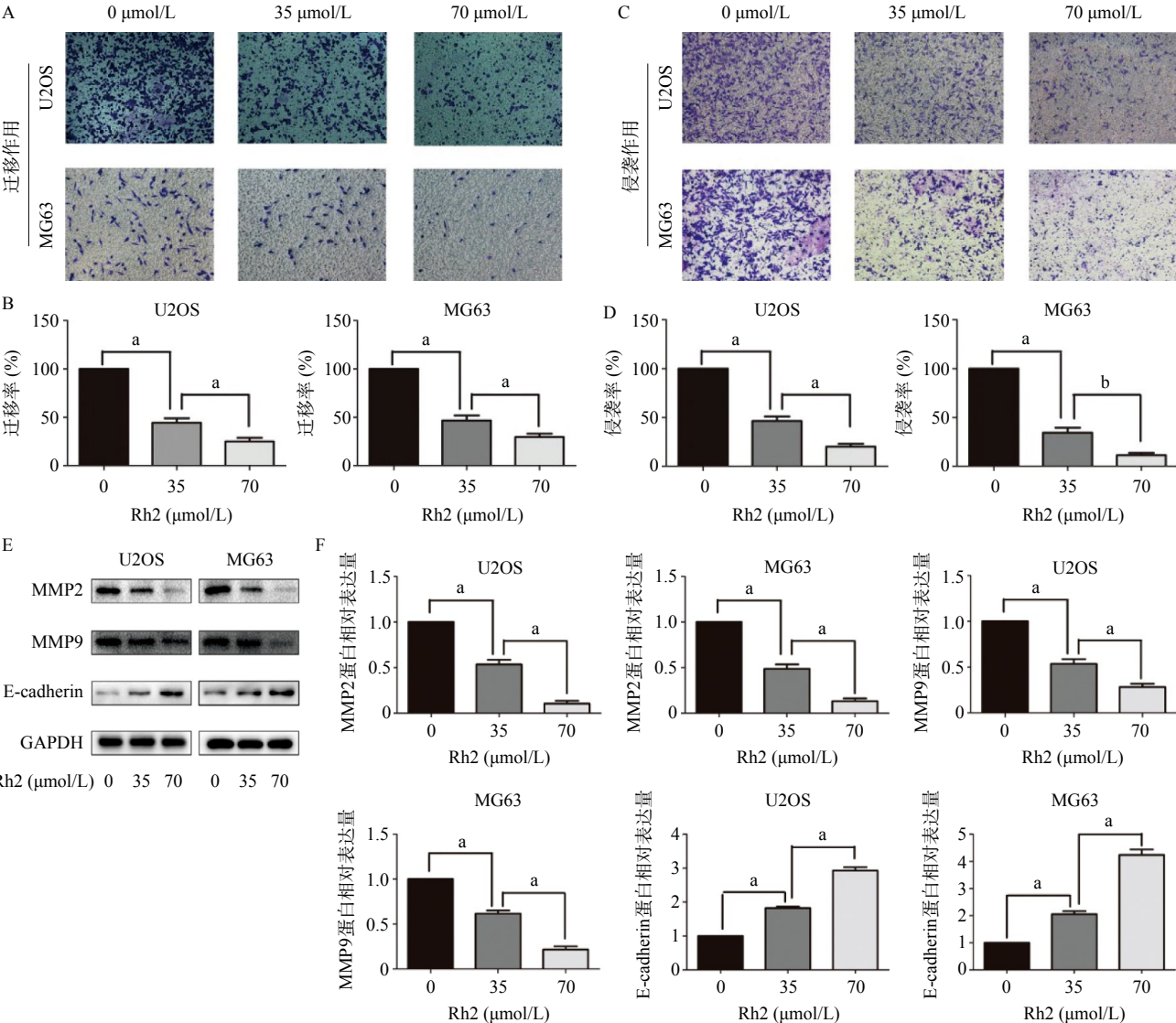
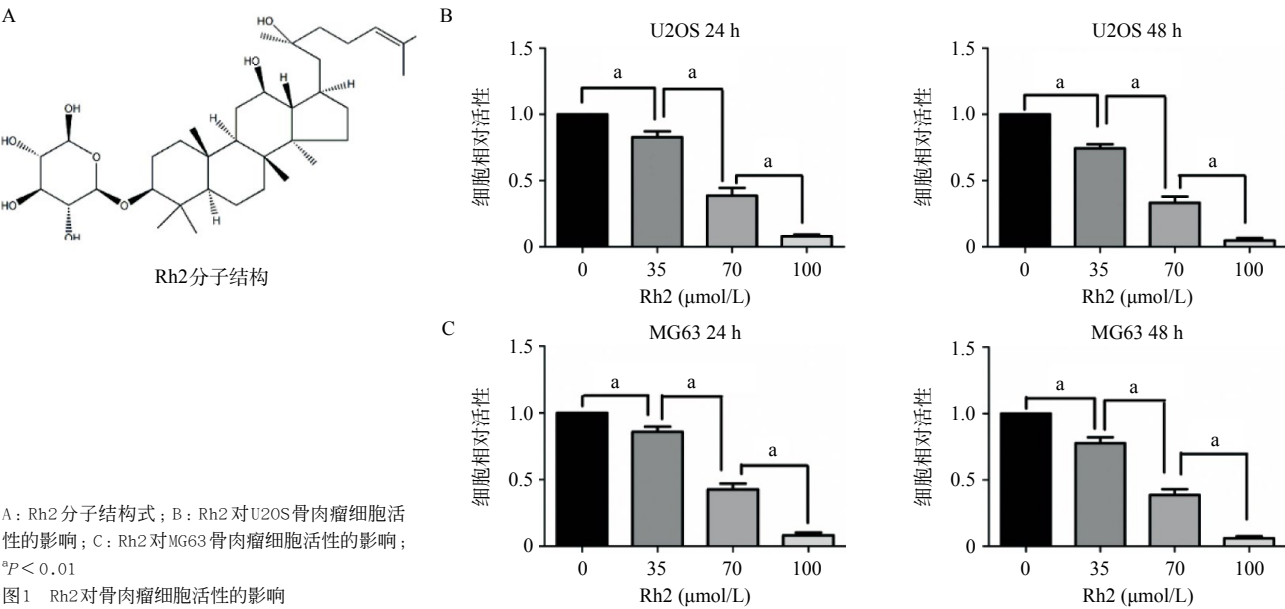
1.7 统计学处理方法 采用SPSS20.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,每组实验重复3次,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rh2对骨肉瘤细胞活性的影响 用不同浓度的Rh2(0、35、70和100 μ mol/L)处理U2OS和MG63骨肉瘤细胞24和48 h后,细胞的活性显著下降,并呈浓度依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。

2.2 Rh2对骨肉瘤细胞迁移和侵袭的影响 经Rh2预处理后,骨肉瘤细胞的迁移与侵袭能力呈浓度依赖性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2A-D。而在蛋白表达的水平上,Rh2可以显著地降低MMP2和MMP9蛋白的表达,并同时增强E-cadherin蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2E、图2F。Rh2通过调节MMP2、MMP9和E-cadherin蛋白的表达来抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭。

2.3 Rh2对骨肉瘤细胞凋亡的影响 Rh2可以呈剂量依赖性地促进骨肉瘤细胞的凋亡,差异有统计学



A、B: Rh2 处理骨肉瘤细胞 24 h 后细胞迁移能力的变化; C、D: Rh2 处理骨肉瘤细胞 24 h 后细胞侵袭能力的变化; E、F: Rh2 处理骨肉瘤细胞 24 h 后 MMP2、MMP9 和 E-cadherin 蛋白表达水平。^a $P < 0.01$

图2 Rh2对骨肉瘤细胞迁移和侵袭的影响

意义 ($P < 0.05$), 见图 3A。Rh2 增加了骨肉瘤细胞中 Bax 的表达, 抑制了 Bcl-2 和 PARP 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3B、图 3C。提示 Rh2 通过调节凋亡相关蛋白的表达促进骨肉瘤细胞的凋亡反应。

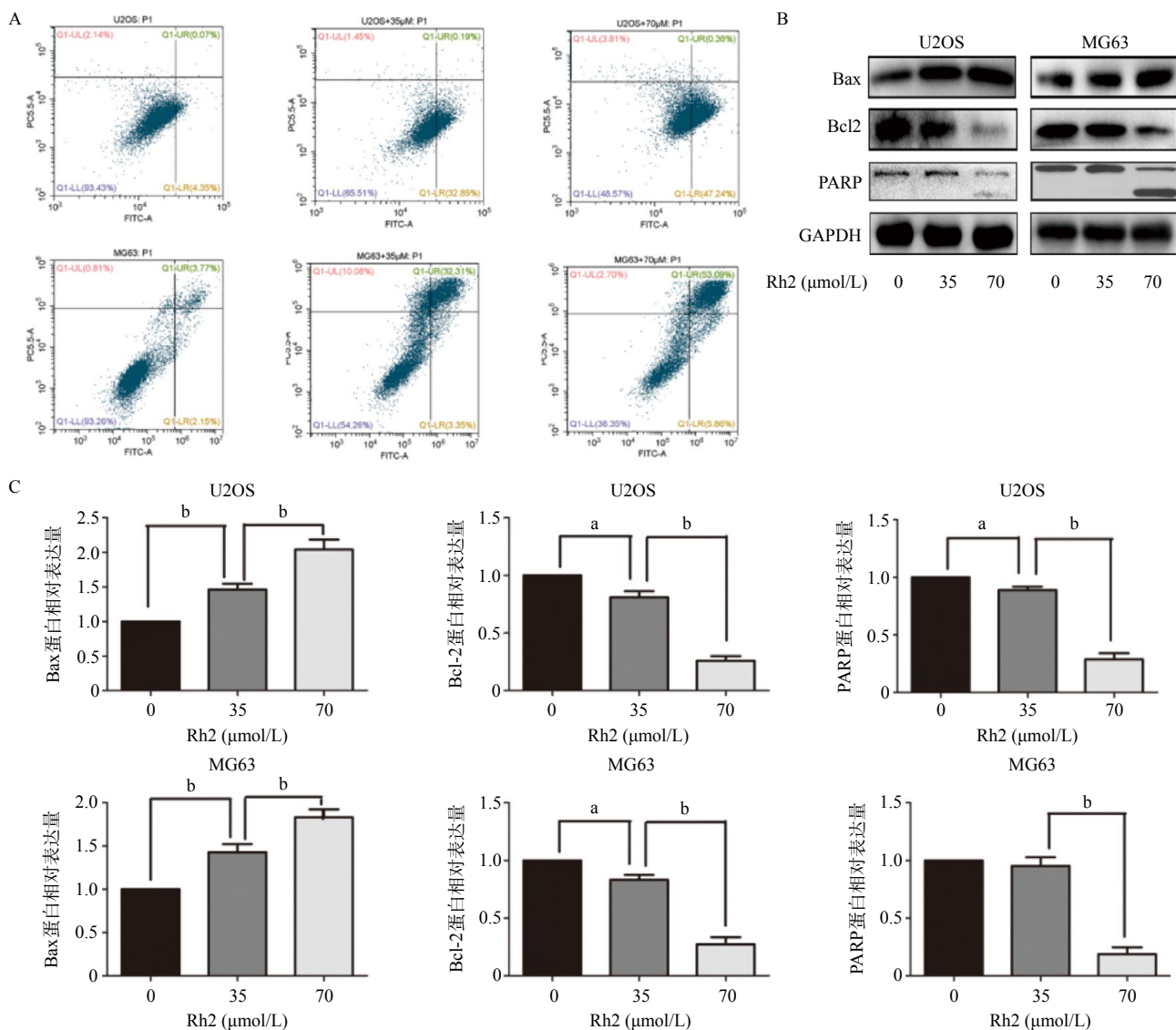
2.4 Rh2 对骨肉瘤细胞中 GSK-3 β /Wnt 双信号通路的影响 Rh2 可下调骨肉瘤细胞中 β -catenin、Cyclin D1 和 C-myc 蛋白的表达, 同时上调 GSK-3 β 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。Rh2 可能是通过调节骨肉瘤细胞中 GSK-3 β /Wnt 双信号通路相关蛋白的表达起到抗肿瘤的作用。

3 讨论

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的恶性骨肿瘤之一, 因其具有高度的侵袭与易复发的特性, 患者

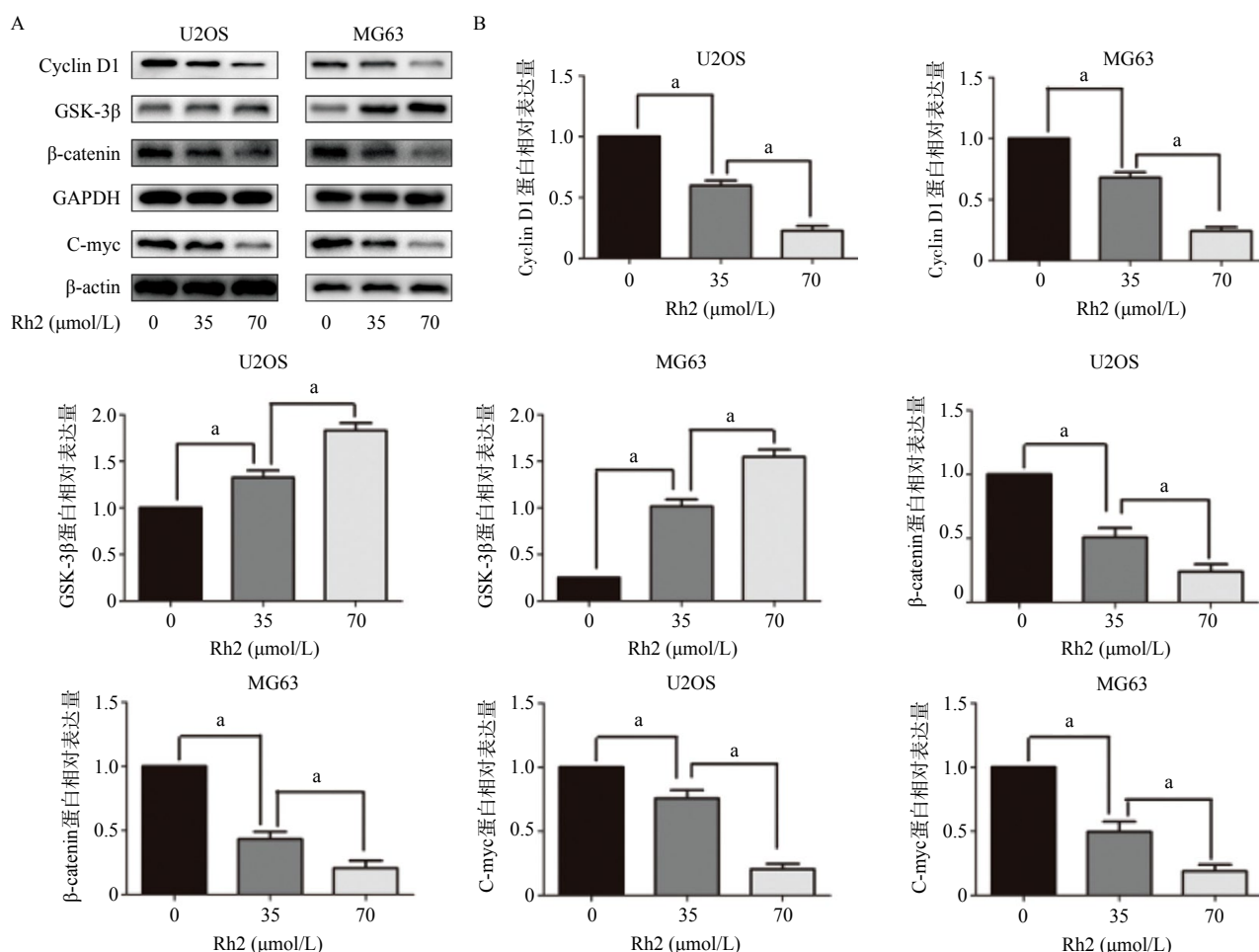
的预后通常都不理想。目前临床上对于骨肉瘤患者的主要治疗方法为手术联合化疗, 但多数化疗药物在治疗的同时也具有一定的不良反应, 导致患者的治疗效果不佳^[6]。因此, 研发一种对骨肉瘤治疗敏感且不良反应较弱的新型高效化疗药物成为了迫切的需求。

多项研究表明 Rh2 具有抗侵袭、抗转移、抗增殖等多种抗肿瘤作用^[7]。此外, Rh2 还可以减轻患者化疗后的各种不良反应, 如脱发、贫血和呕吐等症状^[8]。SONG 等^[9]研究表明 Rh2 在抑制人肝癌细胞系增殖方面具有良好的作用, 且其抑制作用呈现时间-剂量依赖性。POPOVICH 等^[10]研究证明 Rh2 对结直肠癌细胞具有显著的细胞毒性作用。LEE 等^[11]指出 Rh2 还在抑制乳腺癌细胞增殖方面具有较好的作用。以上研究结果证明 Rh2 作为一种新型抗肿瘤药物可



A: 骨肉瘤细胞经过 0、35 和 70 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rh2 处理后流式细胞仪检测结果; B、C: Rh2 对骨肉瘤细胞中凋亡相关蛋白的影响。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 3 Rh2 对骨肉瘤细胞凋亡的影响



A: 骨肉瘤细胞经过0、35和70 $\mu\text{mol/L}$ Rh2处理24 h后 β -catenin、Cyclin D1、C-myc和GSK-3 β 蛋白条带图; B: 骨肉瘤细胞经过0、35和70 $\mu\text{mol/L}$ Rh2处理24 h后 β -catenin、Cyclin D1、C-myc和GSK-3 β 蛋白柱状图。^a $P < 0.01$

图4 Rh2对骨肉瘤细胞中GSK-3 β /Wnt双信号通路的影响

以在多种肿瘤细胞中起到良好的治疗作用。

细胞凋亡也被称为细胞的程序性死亡,分为内源性及外源性凋亡途径两种主要方式^[12]。细胞凋亡作用的缺失是肿瘤发生的重要原因之一,而Rh2可以通过促进肿瘤细胞凋亡来达到抗肿瘤的作用^[13]。抗凋亡相关蛋白Bcl-2和凋亡相关蛋白Bax是调节细胞凋亡反应的主要蛋白之一,通过下调Bcl-2,上调Bax蛋白在肿瘤细胞中的表达量可以促进其凋亡反应^[14]。本研究发现Rh2可以促进骨肉瘤细胞中Bax蛋白的表达,并下调Bcl-2蛋白的表达,进而起到抗肿瘤的作用。

研究表明GSK-3 β /Wnt双信号通路在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及细胞的凋亡等方面均有一定的调节作用,在多种肿瘤细胞中均可以发现GSK-3 β /Wnt双信号通路及其相关蛋白被大量激活^[15]。因此,通过抑制GSK-3 β /Wnt信号通路及其相关蛋白的表达即可起到抗肿瘤的作用。本研究发现Rh2可以通过下调 β -catenin、Cyclin D1、C-myc蛋白的表达,

上调GSK-3 β 蛋白的表达,进而起到抗肿瘤的作用。

本研究通过使用不同浓度的人参皂苷Rh2处理骨肉瘤细胞以探讨其抗肿瘤的作用。MTT实验结果表明,Rh2对MG63和U2OS骨肉瘤细胞的增殖有显著的抑制作用,且其抑制作用呈时间及剂量依赖性。通过迁移和侵袭实验可以证明Rh2能有效抑制骨肉瘤细胞的转移。通过FITC-Annexin V/PI双染色法检测骨肉瘤细胞的凋亡,结果表明Rh2可以促进骨肉瘤细胞的凋亡反应,进而起到抗肿瘤的作用。本研究还通过Western blot法证明Rh2可调节骨肉瘤细胞中细胞周期相关蛋白、凋亡相关蛋白、转移相关蛋白和GSK-3 β /Wnt信号通路相关蛋白的表达来起到抗肿瘤的作用。

参考文献

- [1] OTOUKESH B, BODDOUHI B, MOGHATAEI M, et al. Novel molecular insights and new therapeutic strategies in osteosarcoma[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 158.

- [2] YANG S, CHEN J, TAN T, et al. Evodiamine exerts anticancer effects against 143B and MG63 cells through the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 2875-2888.
- [3] LI X, LU Q, XIE W, et al. Anti-tumor effects of triptolide on angiogenesis and cell apoptosis in osteosarcoma cells by inducing autophagy via repressing Wnt/ β -Catenin signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2): 443-449.
- [4] ZHANG G, HE L, CHEN J, et al. Ginsenoside Rh2 activates α -catenin phosphorylation to inhibit lung cancer cell proliferation and invasion[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(4): 2913-2922.
- [5] JEONG D, HAM J, PARK S, et al. Ginsenoside Rh2 suppresses breast cancer cell proliferation by epigenetically regulating the long noncoding RNA C3orf67-AS1[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(7): 1643-1658.
- [6] JAWAD M U, CHEUNG M C, CLARKE J, et al. Osteosarcoma: Improvement in survival limited to high-grade patients only[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(4): 597-607.
- [7] KIM J H, CHOI J S. Effect of ginsenoside Rh-2 via activation of caspase-3 and Bcl-2-insensitive pathway in ovarian cancer cells[J]. *Physiol Res*, 2016, 65(6): 1031-1037.
- [8] JIA W W, BU X, PHILIPS D, et al. Rh2, a compound extracted from ginseng, hypersensitizes multidrug-resistant tumor cells to chemotherapy[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004, 82(7): 431-437.
- [9] SONG B K, KIM K M, CHOI K D, et al. Production of the rare ginsenoside Rh2-MIX (20(S)-Rh2, 20(R)-Rh2, Rk2, and Rh3) by enzymatic conversion combined with acid treatment and evaluation of its anti-cancer activity[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(7): 1233-1241.
- [10] POPOVICH D G, KITTS D D. Mechanistic studies on protopanaxadiol, Rh2, and ginseng (*Panax quinquefolius*) extract induced cytotoxicity in intestinal Caco-2 cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2004, 18(3): 143-149.
- [11] LEE H, LEE S, JEONG D, et al. Ginsenoside Rh2 epigenetically regulates cell-mediated immune pathway to inhibit proliferation of MCF-7 breast cancer cells[J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(4): 455-462.
- [12] ELMORE S. Apoptosis: A review of programmed cell death [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [13] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-619.
- [14] SU L, SUYILA Q, YANG L, et al. Bax is involved in the anticancer activity of velcade in colorectal cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4): 3179-3183.
- [15] SHIMOZAKI S, YAMAMOTO N, DOMOTO T, et al. Efficacy of glycogen synthase kinase-3 β targeting against osteosarcoma via activation of β -catenin[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 77038-77051.

(本文编辑: 吴彬)

· 消 息 ·

新突破! 温州医科大学国家自然科学基金立项创佳绩

9月8日, 2022年国家自然科学基金集中受理项目评审结果公布, 温州医科大学共获批国家自然科学基金资助项目117项, 获资助直接经费5 731万元, 经费数创历史新高。

在117个立项项目中, 重点项目1项, 优秀青年科学基金2项, 外国资深学者项目2项, 面上项目62项, 青年项目50项。其中, 老年研究院宋伟宏院士依托附属第二医院、育英儿童医院获得国家自然基金重点项目; 精神医学学院刘芳院士和附属眼视光医院Higuchi Akon教授获批外国资深学者项目; 检验医学院(生命科学学院)方合志教授和附属眼视光医院李星熠教授获批优秀青年科学基金项目, 这是我校历史上首次同年获批两项优青类项目。

(温州医科大学新闻中心)