

人参皂苷 Rg3 通过活性氧/c-Jun 氨基末端激酶对骨肉瘤细胞凋亡与自噬影响

李曼玲, 白曼莫, 吴海波
三亚市中医院 骨科,海南 三亚 572000

[摘要] 目的 探讨人参皂苷 Rg3(G-Rg3)通过活性氧(ROS)/c-Jun 氨基末端激酶(JNK)对骨肉瘤细胞凋亡和自噬的影响及可能机制。方法 体外培养人骨肉瘤细胞(MG63),用不同剂量 G-Rg3(0、40、80、160 μmol/L)进行干预。为分析 G-Rg3 的作用机制,将细胞分为对照(Con)组、G-Rg3 组(160 μmol/L G-Rg3 干预)、G-Rg3 + N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(160 μmol/L G-Rg3和 ROS 清除剂 NAC 进行干预)、G-Rg3 + SP600125 组(160 μmol/L G-Rg3 和 JNK 特异性抑制剂 SP600125 进行干预)。采用流式细胞术检测细胞凋亡和 ROS 水平;激光共聚焦显微镜观察细胞自噬;蛋白免疫印迹法检测凋亡蛋白(BAX、Bcl-2)、自噬蛋白(Beclin1 和 P62)和磷酸化 JNK(p-JNK)蛋白表达水平。结果 不同浓度 G-Rg3 均可诱导 MG63 细胞发生凋亡,使 BAX 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平下降,且存在剂量依赖性($P < 0.05$)。激光共聚焦显微镜观察到不同浓度 G-Rg3 均可诱导 MG63 细胞发生自噬,LC3 puncta 数目形成增加,使 Beclin1 蛋白表达水平升高,P62 蛋白水平下降,且存在剂量依赖性($P < 0.05$)。与 CON 组比较,G-Rg3 组细胞凋亡率、LC3 puncta 数目、ROS 水平、p-JNK 蛋白、BAX 蛋白和 Beclin1 蛋白水平较高($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白和 P62 蛋白表达水平较低($P < 0.05$)。与 G-Rg3 组比较,G-Rg3 + NAC 组和 G-Rg3 + SP600125 组细胞凋亡率、LC3 puncta 数目、p-JNK 蛋白、BAX 蛋白和 Beclin1 蛋白水平较低($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白和 P62 蛋白表达水平较低($P < 0.05$)。结论 G-Rg3 可能通过 ROS/JNK 通路诱导骨肉瘤 MG63 细胞发生凋亡和自噬。

[关键词] 人参皂苷 Rg3; 活性氧; c-Jun 氨基末端激酶; 骨肉瘤

中图分类号:R738.1 DOI: 10.16048/j.issn.2095-5561.2022.01.09 文章编号:2095-5561(2022)01-0029-06

Effects of ginsenoside Rg3 on apoptosis and autophagy of osteosarcoma cells through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase

LI Man-ling, BAI Man-mo, WU Hai-bo(Department of Orthopaedics, SanYa Hospital of Traditional Chinese Medicine, SanYa 572000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ginsenoside Rg3(G-Rg3) on apoptosis and autophagy of osteosarcoma cells through reactive oxygen species(ROS)/c-Jun N-terminal kinase(JNK) and its possible mechanism. **Methods** Human osteosarcoma cells(MG63) were cultured in vitro, and different doses of G-Rg3(0, 40, 80, 160 μmol/L) were used for intervention. In order to analyze the mechanism of G-Rg3, the cells were divided into CON group, G-Rg3 group(intervention with 160 μmol/L G-Rg3), G-Rg3 + NAC group(using 160 μmol/L G-Rg3 and ROS scavenger NAC Intervention), G-Rg3 + SP600125 group(intervention with 160 μmol/L G-Rg3 and JNK specific inhibitor SP600125). Flow cytometry was used to detect cell apoptosis and ROS levels; laser confocal microscopy was used to observe cell autophagy; Western-blot was used to detect apoptosis proteins(BAX, Bcl-2), autophagy proteins(Beclin1 and P62) and Phosphorylated JNK(p-JNK) protein expression level. **Results** Different concentrations of G-Rg3 can induce apoptosis of MG63 cells, increase the expression level of BAX protein, and decrease the expression level of Bcl-2 protein, and there is a dose-dependent($P < 0.05$). Laser confocal microscopy observed that different concentrations of G-Rg3 could induce autophagy in MG63 cells, the formation of LC3 puncta increased, the expression of Beclin1 protein increased, and the level of P62 protein decreased, and there was a dose-dependent($P < 0.05$). Compared with the CON group, the apoptosis rate, LC3 puncta number, ROS level, p-JNK protein, BAX protein and Beclin1 protein levels were higher in the G-Rg3 group($P < 0.05$), while the expression levels of Bcl-2 protein and P62 protein were Lower($P < 0.05$). Compared with the G-Rg3 group, the apoptosis rate, LC3 puncta number, p-JNK protein, BAX protein and Beclin1 protein levels were lower in the G-Rg3 + NAC group and the G-Rg3 + SP600125 group($P < 0.05$), while The expression levels of the Bcl-2 protein and P62 protein were lower($P < 0.05$). **Conclusion** G-Rg3 may induce apoptosis and autophagy in

osteosarcoma MG63 cells through the ROS/JNK pathway.

Key words: Ginsenoside Rg3; Reactive oxygen species; c-Jun N-terminal kinase; Osteosarcoma

骨肉瘤是一种多基因改变疾病,好发于儿童和青少年。骨肉瘤的恶性程度较高,容易发生转移,临床上约 80% 患者在确诊时已经发生转移^[1]。有研究显示,转移性骨肉瘤患者 5 年存活率仅 10% ~ 20%^[1]。目前,临床采用手术、新辅助化疗等综合治疗方案治疗骨肉瘤,极大提高了患者的 5 年存活率,但仍有 27% 接受化疗患者 3 年内出现局部复发;另外,化疗药的不良反应较大,严重影响了患者的生活质量^[2]。寻找新型、安全的治疗药物是临床亟待解决的问题。人参皂苷 Rg3 (ginsenoside Rg3, G-Rg3) 是人参中的主要活性成分,具有强大的药理学活性,具有抗氧化、抗炎、神经保护和抗肿瘤等作用^[3]。有研究表明,G-Rg3 可作用于肿瘤发生的不同环节,如增殖、侵袭、凋亡和自噬等,通过多种生物学机制发挥抗癌作用^[4-5]。关于 G-Rg3 治疗骨肉瘤疗效的研究较少。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是生物有氧代谢的副产物,正常生理状态下,ROS 可以促进细胞的增殖和分化,但过量 ROS 可造成细胞氧化应激损伤。ROS 可以激活下游丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 诱导细胞发生凋亡和自噬。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是 MAPK 家族的重要成员之一,ROS/JNK 通路可能是治疗骨肉瘤的潜在靶点^[6-7]。本研究通过分析 G-Rg3 对骨肉瘤细胞凋亡、自噬的影响,及其对 ROS/JNK 通路的作用,旨在为 G-Rg3 的应用提供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 G-Rg3 购于山东维奇生物科技有限公司;ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)、JNK 特异性抑制剂 SP600125 均购自北京百奥莱博科技有限公司;PRMI 1640 培养基、Opti-MEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素链霉素双抗均购于上海语纯生物科技有限公司;MTT 检测试剂盒、流式细胞分析试剂盒、LipofectinTM3000 转染试剂、EGFP-LC3 质粒、BAX 抗体、Bcl-2 抗体、Beclin1 抗体、P62 抗体、p-JNK 抗体和 GAPDH 内参抗体均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;ROS 检测试剂盒购于上海齐源生物科技有限公司。

1.2 细胞培养 人骨肉瘤细胞 (MG63) 购于上海中科院细胞库,将细胞培养于含 1% 青霉素链霉素双抗、10% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养基中,37℃、5% CO₂ 条件下培养,每 3 d 传代 1 次。本研究所用细胞为对数生长期细胞。

1.3 G-Rg3 对 MG63 细胞活力、凋亡和自噬的影响

1.3.1 MTT 检测肿瘤细胞活力 96 孔板中接种 MG63 细胞,每孔 100 μl,加入不同剂量的 G-Rg3 (0、40、80、160 μmol/L)^[8],在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h,每个培养孔加入 MTT 溶液 50 μl,温室孵育 4 h,随后吸出上清液,加入二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液,150 μl。用酶标仪在 570 nm 处检测光密度值 (optical density, OD) 值。本研究重复 4 次。

1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡 将 MG63 细胞以 5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板中,每孔加入 2 ml 无双抗培养基,24 h 后分别加入不同剂量的 G-Rg3 (0、40、80、160 μmol/L)^[8],24 h 后用胰酶消化收集细胞,加入 400 μl 结合液重悬细胞,随后再加入 5 μl Annexin V-FITC,4℃ 孵育 15 min。用流式细胞仪和 Flowjo V7 软件检和分析测凋亡率。本研究重复 4 次。

1.3.3 激光共聚焦显微镜观察细胞自噬 将 MG63 细胞接种于激光共聚焦培养皿中,细胞贴壁后用 LipofectinTM3000 进行转染。转染前用 Opti-MEM 培养液将 EGFP-LC3 质粒 (500 ng) 和转染试剂 (5 μl) 配置成对应的溶液,二者混匀后室温放置 15 min。随后将混合液加入 6 孔板,37℃ 培养 6 h,更换培养液为含 1% 胎牛血清的 PRMI 1640 培养液,培养 24 h 后倒置激光共聚焦显微镜观察 LC3 puncta 数目。

1.3.4 蛋白免疫印迹法检测凋亡和自噬蛋白表达水平 RAPI 裂解液提取细胞中的总蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜上。随后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 BAX 抗体 (1:500)、Bcl-2 抗体 (1:500)、Beclin1 抗体 (1:1 000) 或 P62 抗体 (1:500),4℃ 过夜孵育,次日除去一抗,用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后加入二抗,封闭 1 h。ECL 发光仪进行蛋白成像,Image J 软件分析灰度值。本研究重

复 4 次。

1.4 G-Rg3 通过 ROS/JNK 通路诱导 MG63 细胞凋亡和自噬

将细胞分为对照组 (CON) 组,向细胞中加入等量培养液;G-Rg3 组,向细胞中加入 160 $\mu\text{mol/L}$ G-Rg3;G-Rg3 + NAC 组,向细胞中同时加入 160 $\mu\text{mol/L}$ G-Rg3、ROS 清除剂 NAC;G-Rg3 + SP600125 组,同时加入 160 $\mu\text{mol/L}$ G-Rg3、JNK 特异性抑制剂 SP600125。

1.4.1 ROS 检测 细胞培养 48 h 后,用生理盐水洗涤 2 次,随后加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 二氢乙啶,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,用流式细胞术检测细胞中 ROS 的产生,阳性细胞发射红色荧光。细胞 ROS 水平用 ROS 阳性细胞数与总细胞数比值表示。本研究重复 4 次。

1.4.2 细胞凋亡和细胞自噬检测 方法同 1.3.2 和 1.3.3。

1.4.3 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达水平 方法同 1.3.4。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较用 LSD- t 检。计数资料以例 (百分率) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 G-Rg3 对 MG63 细胞活力的抑制作用 应用

40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 G-Rg3 对 MG63 细胞进行干预,细胞活力均受到抑制,并且存在剂量依赖性 ($F = 15.908, P < 0.05$),其中,160 $\mu\text{mol/L}$ 的抑制效应最显著 (图 1)。

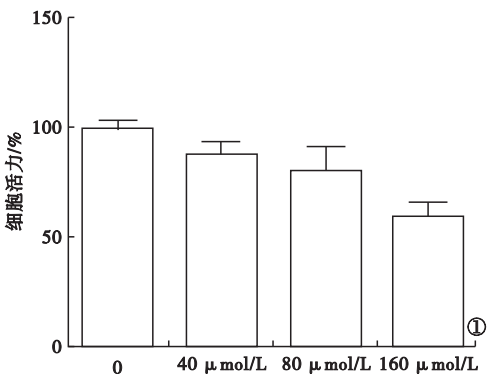


图 1 G-Rg3 对 MG63 细胞活力的抑制作用

2.2 G-Rg3 诱导 MG63 细胞发生凋亡和自噬 不同浓度的 G-Rg3 均可诱导 MG63 细胞发生凋亡 ($F = 19.003, P < 0.05$),使 BAX 蛋白表达水平升高 ($F = 36.120, P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平下降 ($F = 40.002, P < 0.05$),且存在剂量依赖性 (图 2)。激光共聚焦显微镜观察到不同浓度 G-Rg3 均可诱导 MG63 细胞发生自噬,LC3 puncta 数目形成增加 ($F = 21.542, P < 0.05$),使 Beclin1 蛋白表达水平升高 ($F = 18.334, P < 0.05$),P62 蛋白水平下降 ($F = 17.281, P < 0.05$),且存在剂量依赖性 (图 3)。

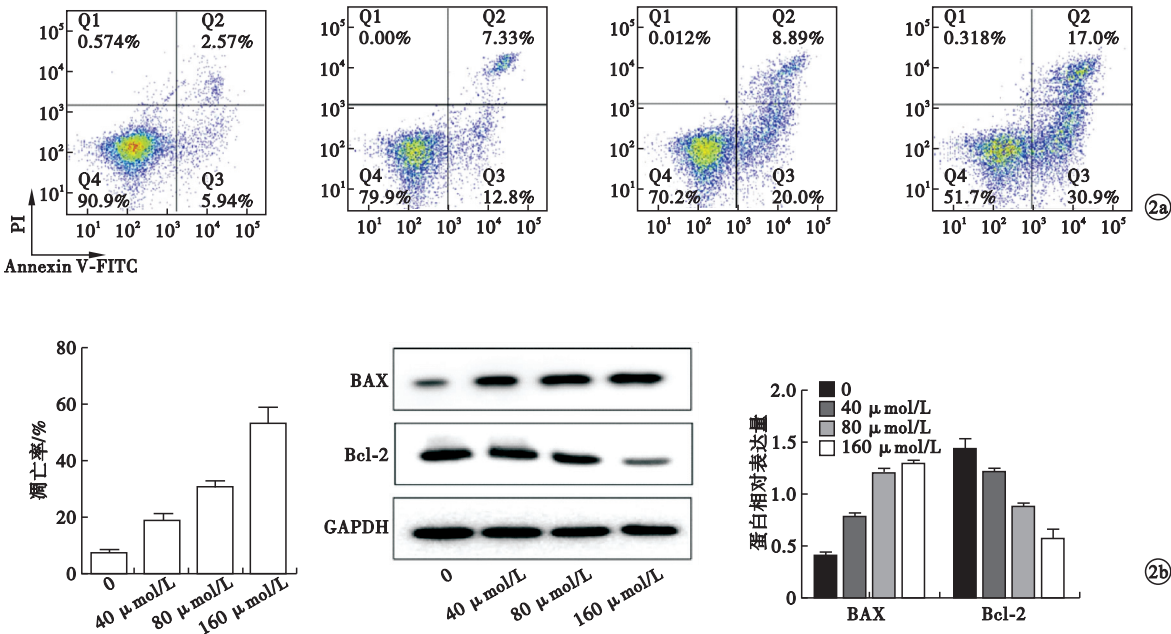


图 2 不同浓度 G-Rg3 对 MG63 细胞凋亡的影响(a. 流式细胞术检测细胞凋亡;b. 蛋白免疫印迹法检测凋亡蛋白表达)

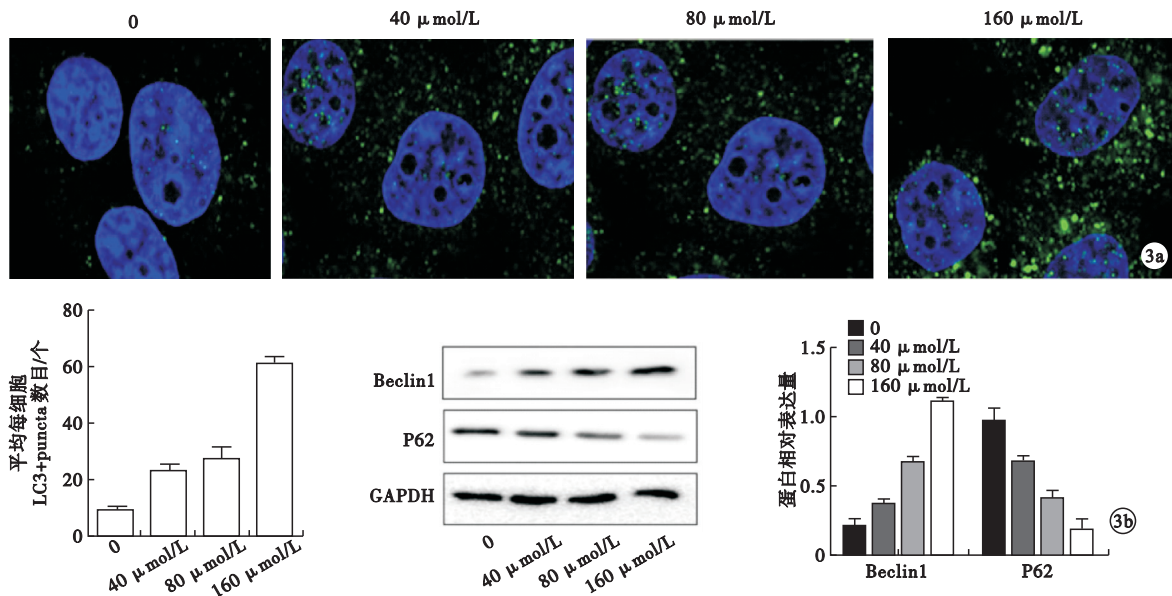
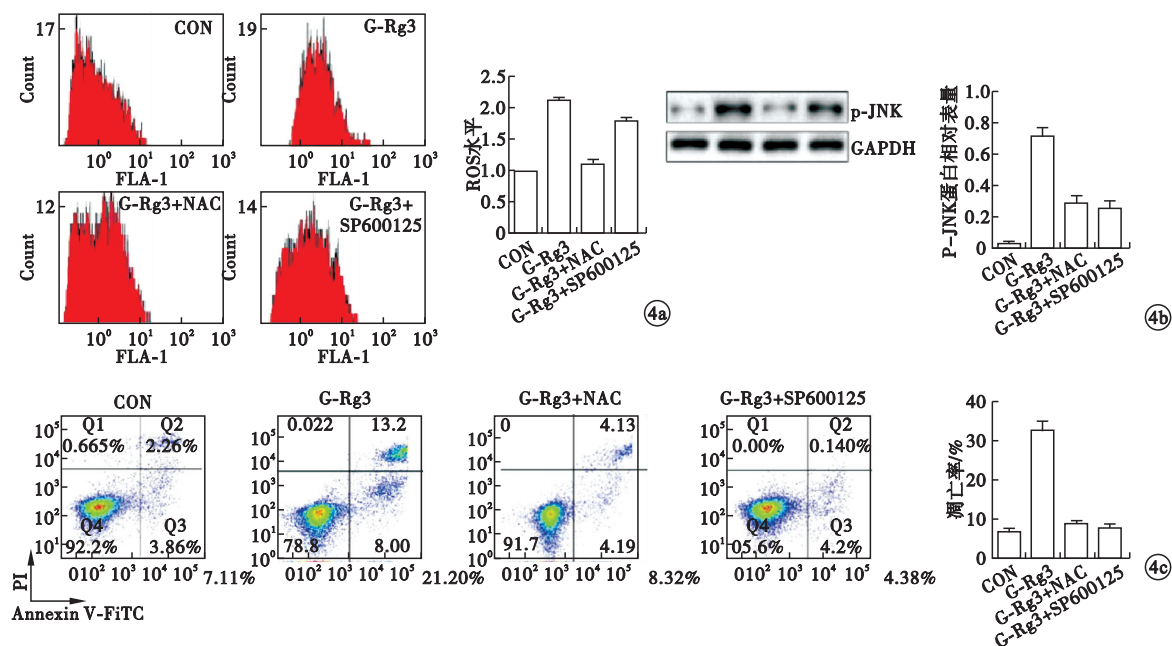


图3 不同浓度 G-Rg3 对 MG63 细胞自噬的影响 [a. 激光共聚焦显微镜观察细胞自噬(400 倍); b. 蛋白免疫印迹法检测凋亡蛋白表达]

2.3 G-Rg3 通过 ROS/JNK 通路诱导 MG63 细胞凋亡和自噬 G-Rg3 (160 $\mu\text{mol/L}$) 可以明显诱导 MG63 细胞 ROS 的产生 ($P < 0.05$) 和 JNK 的活化 ($P < 0.05$), 使细胞发生凋亡 ($P < 0.05$) 和自噬 ($P < 0.05$)。NAC 可以抵消 G-Rg3 诱导细胞凋亡 ($P = 0.004$)、自噬 ($P = 0.009$)、ROS ($P < 0.001$) 和 JNK ($P < 0.001$) 活化的效应。在细胞中加入 SP600125 后, G-Rg3 无法诱导细胞凋亡 ($P <$

0.001)、自噬 ($P < 0.001$) 和 JNK 活化 ($P < 0.001$), 但是对 ROS ($P = 0.201$) 产生无影响(图4)。G-Rg3 使 MG63 细胞 BAX ($P < 0.001$) 和 Beclin1 ($P = 0.002$) 蛋白表达水平升高, 使 Bcl-2 ($P < 0.001$) 和 P62 ($P < 0.001$) 蛋白水平降低。NAC 可以抵消 G-Rg3 引起的 BAX ($P < 0.001$) 和 Beclin1 ($P = 0.006$) 蛋白表达水平升高, 抵消 Bcl-2 ($P < 0.001$) 和 P62 ($P < 0.001$) 蛋白水平降低。在细胞中加入 SP600125



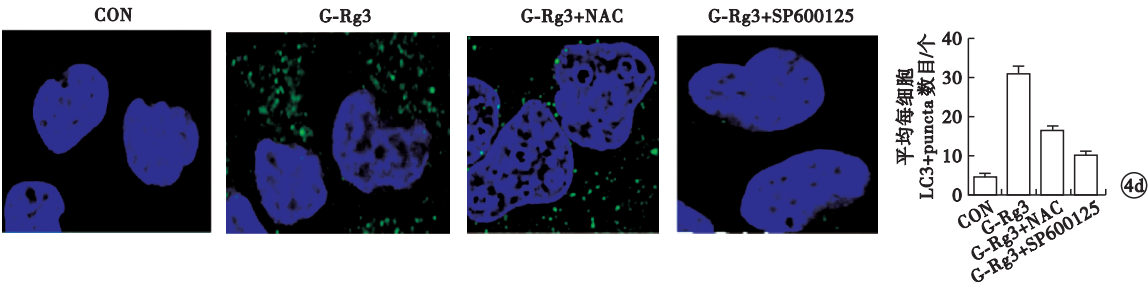


图 4 G-Rg3 (160 $\mu\text{mol/L}$) 通过 ROS/JNK 通路诱导 MG63 细胞凋亡和自噬 [a. 流式细胞术检测 ROS 水平 (与 CON 比值); b. 蛋白免疫印迹法检测 p-JNK 蛋白表达水平; c. 流式细胞术检测细胞凋亡; d. 免疫荧光观察细胞自噬]

后, G-Rg3 无法引起 BAX ($P < 0.001$) 和 Beclin1 水平升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 ($P = 0.002$) 和 P62 ($P =$

0.001) 水平下降 (图 5)。以上说明, G-Rg3 诱导 MG63 细胞凋亡和自噬的信号通路为 ROS/JNK 途径。

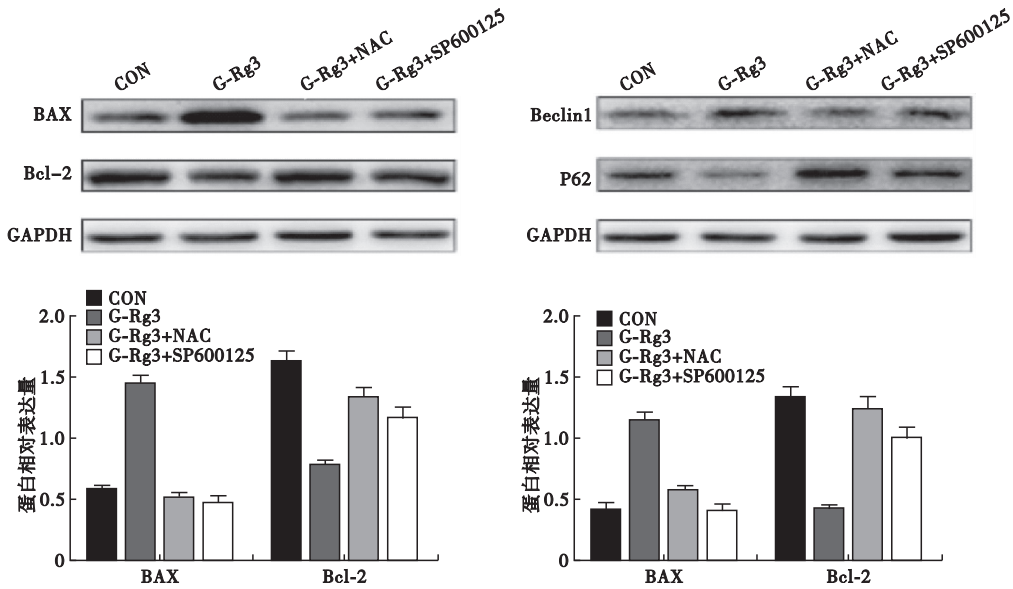


图 5 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达水平

3 讨论

骨肉瘤预后较差, 寻找新的治疗药物势在必行^[9]。人参是传统中药材, 其活性成分 G-Rg3 近年来备受关注。G-Rg3 属于人参二醇型四环三萜类皂苷, 具有抗肿瘤活性, 其机制可能为: 诱导凋亡和抑制增殖、抑制上皮间质转化、抑制肿瘤细胞干性、激活内质网应激、调节表观遗传修饰、促进 DNA 损伤修复、抑制糖酵解^[10]。本研究通过体外研究发现, 不同浓度 G-Rg3 均能有效抑制骨肉瘤细胞 MG63 细胞活力, 诱导细胞发生凋亡和自噬, 且存在剂量依赖性。类似的, 既往研究亦发现, G-Rg3 能抑制结直肠癌、乳腺癌、肝细胞癌等细胞增殖^[11-13]。

ROS 是细胞代谢的副产物, 少量 ROS 可以促进细胞的增殖、分化, 而过量的 ROS 可造成细胞氧

化应激损伤^[14]。有研究显示, ROS 可以激活下游 MAPK 信号通路, 抑制细胞增殖^[14]。JNK 是 MAPK 信号通路的重要分支, 在细胞氧化应激损伤和免疫炎症损伤过程中起重要作用^[15]。有研究表明, JNK 激活能明显诱导骨肉瘤细胞的凋亡和自噬, 抑制增殖^[16]。通过 ROS/JNK 信号通路可能开发出骨肉瘤的潜在治疗药物^[17-19]。

本研究采用 160 $\mu\text{mol/L}$ G-Rg3 进行后续机制研究。本研究结果显示, ROS 清除剂可以抵消 G-Rg3 诱导细胞凋亡、自噬、ROS 和 JNK 活化效应。在细胞中加入 JNK 特异性抑制剂 SP600125 后, G-Rg3 无法诱导细胞凋亡、自噬和 JNK 活化, 但对 ROS 产生无影响。BAX 和 Bcl-2 是细胞凋亡标志物, Beclin1 和 P62 是细胞自噬标志物。NAC 可以

抵消 G-Rg3 引起的 BAX 和 Beclin1 蛋白表达水平升高,抵消 Bcl-2 和 P62 蛋白水平降低。在细胞中加入 SP600125 后,G-Rg3 无法引起 BAX 和 Beclin1 水平升高,Bcl-2 和 P62 水平下降。以上结果说明,G-Rg3 诱导 MG63 细胞凋亡和自噬的信号通路为 ROS/JNK 途径。

综上所述,G-Rg3 可能通过 ROS/JNK 通路诱导骨肉瘤 MG63 细胞发生凋亡和自噬。G-Rg3 可能成为治疗骨肉瘤的潜在药物。本研究亦存在一定局限性,如本研究仅选择了一种骨肉瘤细胞系进行研究;本研究仅进行了体外细胞研究,未在体内进行验证。本研究未分析 G-Rg3 对骨肉瘤细胞周期的影响,有研究发现,G-Rg3 可能通过 ROS 影响前列腺癌细胞周期,进而抑制细胞增殖^[20]。G-Rg3 对骨肉瘤细胞的作用机制需要未来深入分析。

参考文献:

[1] Lilienthal I, Herold N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: a review of current and future strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6885.

[2] Sayles LC, Breese MR, Koehne AL, et al. Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(1): 46-63.

[3] Liu Z, Liu T, Li W, et al. Insights into the antitumor mechanism of ginsenosides Rg3[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2639-2652.

[4] Kim H, Ji HW, Kim HW, et al. Ginsenoside Rg3 prevents oncogenic long noncoding RNA ATXN8OS from inhibiting tumor-suppressive microRNA-424-5p in breast cancer cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 118.

[5] Peng Z, Wu WW, Yi P. The efficacy of ginsenoside Rg3 combined with first-line chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer in china: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 630825.

[6] Wang S, Li H, Chen S, et al. Andrographolide induces apoptosis in human osteosarcoma cells via the ROS/JNK pathway[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(6): 1417-1428.

[7] Wang G, Zhang T, Sun W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 24-37.

[8] Yang Q, Cai N, Che D, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits the biological activity of SGC-7901[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(8): 4151-4158.

[9] Chen C, Xie L, Ren T, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs[J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1-10.

[10] 乔雪涵, 岳丽玲, 朱文斌. 人参皂苷 Rg3 的抗肿瘤作用研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(10): 1272-1276.

[11] Tang YC, Zhang Y, Zhou J, et al. Ginsenoside Rg3 targets cancer stem cells and tumor angiogenesis to inhibit colorectal cancer progression in vivo[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(1): 127-138.

[12] Nakhjavani M, Hardingham JE, Palethorpe HM, et al. Ginsenoside Rg3: potential molecular targets and therapeutic indication in metastatic breast cancer[J]. *Medicines (Basel)*, 2019, 6(1): 17.

[13] Ren Z, Chen X, Hong L, et al. Nanoparticle conjugation of ginsenoside Rg3 inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis[J]. *Small*, 2020, 16(2): e1905233.

[14] Han L, Ma Q, Yu J, et al. Autophagy plays a protective role during *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis via ROS-MAPK pathway[J]. *Innate Immun*, 2020, 26(7): 580-591.

[15] Wu Q, Wu W, Jacevic V, et al. Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, 35(1): 574-583.

[16] Zhang L, Yang C, Huang Y, et al. Cardamonin inhibits the growth of human osteosarcoma cells through activating P38 and JNK signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111155.

[17] Guo W, Zhang X, Lin L, et al. The disulfiram/copper complex induces apoptosis and inhibits tumor growth in human osteosarcoma by activating the ROS/JNK signaling pathway[J]. *J Biochem*, 2021, 32(6): 112-117.

[18] Ma B, Zhu J, Zhao A, et al. Raddeanin A, a natural triterpenoid saponin compound, exerts anticancer effect on human osteosarcoma via the ROS/JNK and NF-κB signal pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 353: 87-101.

[19] 李恒元, 孙凌凌, 李冰皓, 等. 雷公藤红素通过 ROS/JNK 通路诱导骨肉瘤细胞周期阻滞、凋亡和自噬的研究[J]. *中华骨科杂志*, 2016, 36(8): 490-502.

[20] Peng Y, Zhang R, Yang X, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses the proliferation of prostate cancer cell line PC3 through ROS-induced cell cycle arrest[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 1139-1145.

(收稿日期: 2021-09-29)