

. 实验研究 .

人参皂甙 Rh2 对人胶质瘤细胞 U87MG 凋亡的影响

白 磊 陈 晨 李志磊 霍国进 冯 毅 严飞平

【摘要】目的 观察人参皂甙 Rh2 对胶质瘤细胞凋亡的影响并初步探讨其可能机制。方法 将培养的人胶质瘤细胞 U87MG 随机分为人参皂甙 Rh2 组、人参皂甙 Rh2+尼莫地平组 and 对照组。人参皂甙 Rh2 组在常规培养细胞时加入 20 μg/ml 的人参皂甙 Rh2, 人参皂甙 Rh2+尼莫地平组在人参皂甙 Rh2 组培养细胞时加入浓度为 10 μmol/L 的尼莫地平。利用流式细胞仪检测 U87MG 细胞凋亡, 利用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测 U87MG 细胞内钙离子浓度。结果 与对照组相比, 人参皂甙 Rh2 促进 U87MG 细胞凋亡 ($P<0.05$), 且增加细胞内游离钙离子浓度 ($P<0.05$); 尼莫地平显著减少人参皂甙 Rh2 引起的 U87MG 细胞凋亡 ($P<0.05$)。结论 人参皂甙 Rh2 可以通过增加细胞内游离钙离子浓度促进 U87MG 细胞凋亡。

【关键词】人胶质瘤细胞; U87MG; 人参皂甙 Rh2; 细胞凋亡; 细胞内钙离子浓度

【文章编号】1009-153X(2019)03-0155-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

Effects of genoside Rh2 on the apoptosis of human brain glioma cells U87MG

BAI Lei, CHEN Chen, LI Zhi-lei, HUO Guo-jin, FENG Yi, YAN Fei-ping. Department Of Neurosurgery, Yulin Municipal First Hospital, Yulin 719000, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of genoside Rh2 on the apoptosis of human brain glioma cells and its mechanism. Methods Human brain glioma cells U87MG were randomly divided into two groups, i.e. experimental group in which U87MG cells were cultured in the medium containing 20 μg/ml genoside Rh2 and control group in which U87MG cells were cultured in the medium containing isodose physiological salt solution. The apoptosis of U87MG cells was determined by flow cytometry. And then the intracellular calcium concentration of U387MG cells was measured by laser scanning confocal microscope and flow cytometry. Results The rate of U87MG cells apoptosis and intracellular calcium concentration were significantly higher in the experimental group than those in the control group ($P<0.05$). Moreover the intracellular calcium concentration and the apoptosis rate of U87MG cells raised by genoside Rh2 were significantly decreased by nifedipine [a specitic inhibitor of Ca^{++} channel ($P<0.05$)]. Conclusion Genoside Rh2 can promote apoptosis of human brain glioma U87MG cells by the up-regulation of intracellular calcium concentration.

【Key words】Genoside Rh2; Human brain glioma cells; U87MG cells; Apoptosis; Intracellular calcium concentration

胶质瘤是中枢神经系统发病率最高的恶性肿瘤^[1,2]。由于其呈浸润性生长, 与周围正常组织分界不清, 完全切除困难, 复发率极高, 且随着复发次数的增加, 恶性程度亦增加^[2-5]。研究表明, 钙离子在细胞的增殖、凋亡等过程中发挥重要作用, 而 L 型电压依赖性钙离子通道 (L-type voltage dependent calcium channel, LTCC) 是钙离子进入胶质瘤细胞的主要方式^[6,7]。人参皂甙 Rh2 是人参中的天然成分, 具有脂溶性, 极易通过血脑屏障^[8-10]。本研究探讨人参皂甙 Rh2 对人胶质瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 CO₂ 恒温培养箱购自常州润华

电器公司、倒置相差显微镜购自日本奥林巴斯公司、超净工作台购自苏州净化公司; 膜片钳信号采集设备购自日本尼康公司; 激光共聚焦显微镜购自德国莱卡公司; 流式细胞仪购自美国 B&D 公司。人胶质瘤细胞株 U87MG 购自上海细胞库; DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 人参皂甙 Rh2 购自世洲生物公司; 尼莫地平、Bay K8644 和 Cav1.2 抗体购自 Alomone 公司; 荧光标记钙离子探针 Fluo-3AM 购自碧云天公司; Annexin-V/PI 凋亡试剂盒购自 Roche 公司; 其他耗材及试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取第 5~8 代人胶质瘤细胞 U87MG 细胞株用于实验。将培养的 U87MG 细胞随机分为人参皂甙 Rh2 组和对照组。人参皂甙 Rh2 组加入人参皂甙 Rh2, 浓度为 20 μg/ml, 作用时间为 48 h。对照组加入同量生理盐水。

1.2.2 细胞凋亡检测 利用缓冲液制备的细胞悬液 (细胞密度为 1×10^6 /ml), 按照 Annexin-V/PI 凋亡试

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.03.010
作者单位: 719000 陕西, 榆林市第一医院榆林院区神经外科 (白磊、陈 晨、李志磊、霍国进、冯 毅、严飞平)
通讯作者: 严飞平, E-mail: 43085651@qq.com

剂盒说明,制备反应细胞悬液,然后利用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 钙成像检测 U87MG 细胞内钙离子浓度 利用 Fluo-3AM 对 U87MG 细胞内游离钙离子标记,参照说明设置激光共聚焦显微镜参数。选取 50 个细胞并检测细胞内的相对荧光强度,并利用激光共聚焦显微镜自带软件进行数据分析。

1.2.4 流式细胞仪检测 U87MG 细胞内钙离子浓度 将 U87MG 细胞制备成流式细胞仪合适的细胞悬液,利用 Fluo-3AM 标记 U87MG 细胞内钙离子,上流式细胞仪检测相对荧光强度。激发条件为:发射波长为 525 nm,激发波长为 488 nm。利用自带软件对数据进行分析。

1.2.5 LTCC 特异性抑制剂尼莫地平对 U87MG 细胞凋亡的影响 此部分实验分为三组,人参皂甙 Rh2 组和对照组处理同上,Rh+Nif 组在人参皂甙 Rh2 组培养细胞时加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平。培养 48 h 后检测细胞凋亡情况。

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞凋亡的影响 同对照组相比,人参皂甙 Rh2 组 U87MG 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$,图 1)。

2.2 人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞内钙离子浓度的影响 人参皂甙 Rh2 组 U87MG 细胞内钙离子浓度较对照组明显增高($P < 0.05$,图 2)。

2.3 尼莫地平减少人参皂甙 Rh2 引起的 U87MG 细胞凋亡 与对照组相比,人参皂甙 Rh2 组 U87MG 细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$,图 3);与 人参皂甙 Rh2 组相比,Rh+Nif 组 U87MG 细胞凋亡率明显减少($P < 0.05$,图 3),但 Rh+Nif 组 U87MG 细胞凋亡率明显高于对照组($P < 0.05$,图 3)。

3 讨论

虽然目前胶质瘤的治疗是积极的手术、放疗、化疗等联合措施,但胶质瘤复发率极高,且随着复发次数的增加,恶性程度亦增加,预后极差^[11,12]。因此,寻找胶质瘤治疗新靶点具有重要意义。人参皂甙 Rh2 分子量小,为脂溶性,容易通过血脑屏障^[13]。有研究表明人参皂甙 Rh2 可通过激活半胱天冬酶通路促进肝细胞凋亡,并伴有细胞周期的改变^[14]。还有研究

证实人参皂甙 Rh2 抑制 C6 胶质瘤细胞增殖,并可诱导其凋亡^[12]。本实验观察到人参皂甙 Rh2 促进 U87MG 细胞凋亡。

钙离子在细胞增殖、凋亡等过程中发挥重要作用。而细胞内过多的钙离子可引起钙超载,从而诱导细胞凋亡^[15]。大多数细胞内游离钙离子有两个来源,即外钙内流和内钙释放,前者主要是指细胞外钙离子通过钙离子通道进入细胞内,而细胞表面钙离子通道主要是指是 LTCC^[15];后者主要是指细胞内部内质网等细胞器的释放,但细胞器中钙离子的释放主要是通过通过细胞器表面 Ry 受体等形式释放,可使细胞内的钙离子在短时间内大幅提升^[16,17]。本实验 U87MG 细胞内钙离子浓度持续保持较高水平,未检测到短时间内大幅度的细胞内钙离子浓度波动,故我们将 LTCC 作为机制探讨的重点。

为验证 U87MG 细胞凋亡增加和 U87MG 细胞内钙离子浓度增加的关系,我们在人参皂甙 Rh2 培养的同时加用特异性 LTCC 阻滞剂尼莫地平,发现人参皂甙 Rh2 引起 U87MG 细胞凋亡明显减少。这说明降低 U87MG 细胞内游离钙离子浓度,能够减少人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞凋亡的促进作用。提示人参皂甙 Rh2 可能主要通过增加细胞外钙离子内流,促进 U87MG 细胞凋亡。但是尼莫地平又没能完全消除人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞凋亡的促进作用,这又说明人参皂甙 Rh2 促进 U87MG 细胞凋亡可能还有其他机制。

【参考文献】

- [1] Jue TR, Sena ES, Macleod MR, *et al.* A systematic review and meta-analysis of topoisomerase inhibition in preclinical glioma models [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(13): 11387-11401.
- [2] Tsymbal DO, Minchenko DO, Kryvdiuk IV, *et al.* Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation [J]. *Fiziol Zh*, 2016, 62(1): 3-15.
- [3] 于泽奇,程世翔,涂悦,等. Ki-67、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 在脑胶质瘤组织中的表达及临床意义[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(5): 9-12.
- [4] 呼铁民,孙影,卢庆韬. ADAM17、EGFR 和 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(5): 21-24.
- [5] 侯亮,冯海利. 脑胶质瘤组织中 P-gp、MRP、BCRP 的表达及临床意义[J]. *中国医药导报*, 2016, 14(35): 12-15.

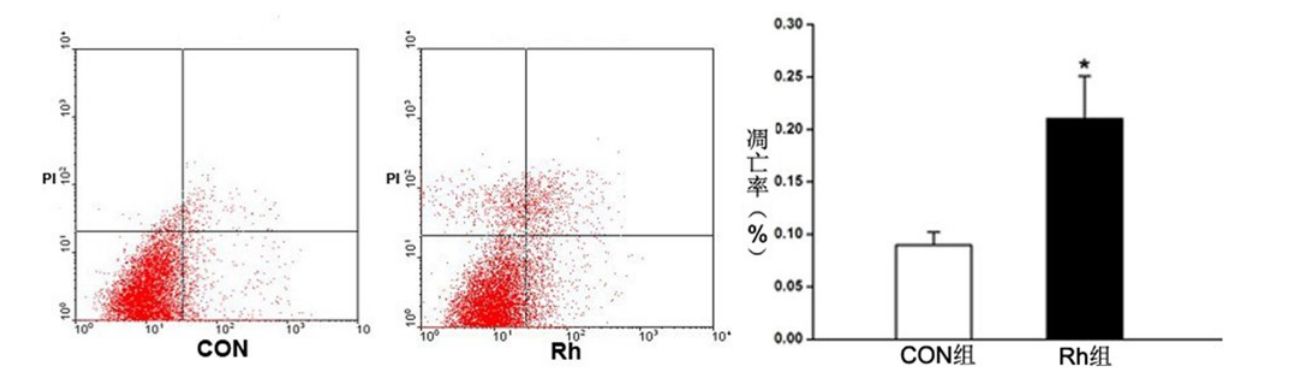


图1 人参皂甙Rh2促进U87MG细胞凋亡
与Con比较,**P*<0.05;Con. 对照组;Rh. 人参皂甙Rh2组

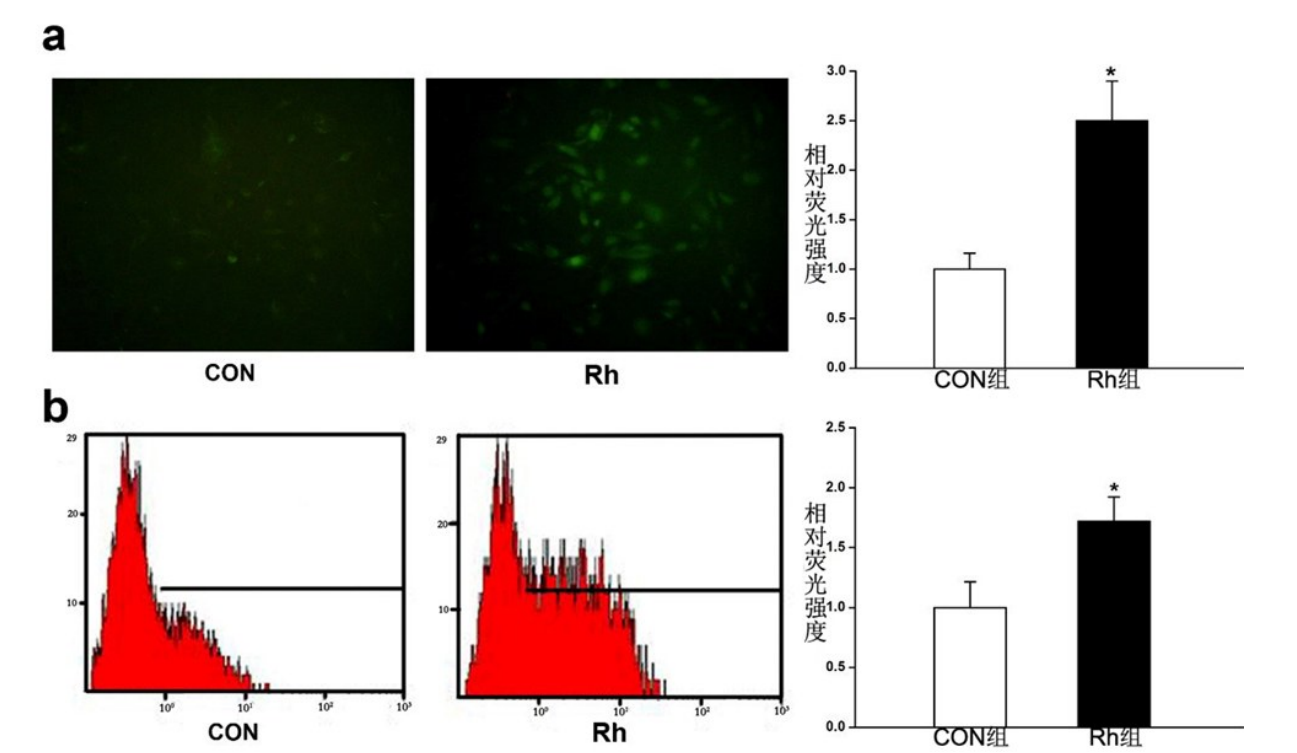


图2 人参皂甙Rh2增加U87MG细胞内钙离子浓度

与Con比较,**P*<0.05;Con. 对照组;Rh. 人参皂甙Rh2组;a. 利用激光共聚焦显微镜检测U87MG细胞内钙离子浓度;b. 利用流式细胞仪检测U87MG细胞内钙离子浓度

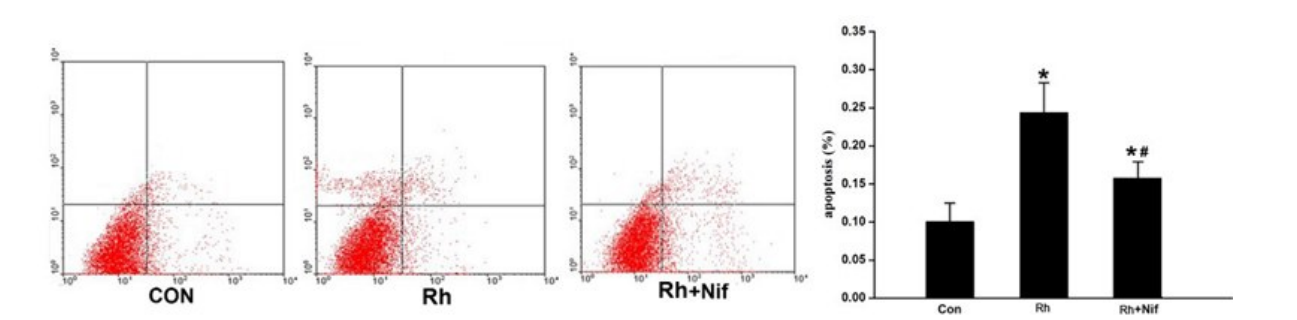


图3 尼莫地平减少人参皂甙Rh2引起的U87MG细胞凋亡

与Con比较,**P*<0.05;与Rh比较,#*P*<0.05;Con. 对照组;Rh. 人参皂甙Rh2组;Rh+nif. 人参皂甙Rh2+尼莫地平组

[6] Moschovos C, Papatheodoropoulos C. The L-type voltage-dependent calcium channel long-term potentiation is higher in the dorsal compared with the ventral associational/commissural CA3 hippocampal synapses [J]. *Neurosci Res*, 2016, 106(11): 62-65.

[7] Sun Z, Cao X, Zhang Z, *et al*. Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by the up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8077.

[8] 姚兴军,洪新雨,刘兴吉,等. 人参皂甙 Rh2 对脑胶质细胞瘤侵袭性的影响[J]. *中国实验诊断学*, 2005, 21: 36-39.

[9] 朱中生,李锦玉,王相智,等. 人参皂甙 Rh2 对大鼠主动脉 TIMP-1、VEGF 表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26(22): 2411-2413.

[10] 李雪甫,刘艳文,王永实. 人参皂甙 Rh2 联合顺铂对食管癌细胞的杀伤作用[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(3): 516-518.

[11] Shen F, Guo Q, Hu Q, *et al*. RelB, a good prognosis predictor, links cell-cycle and migration to glioma tumorigenesis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4404-4410.

[12] Thust SC, Heiland S, Falini A, *et al*. Glioma imaging in Europe: a survey of 220 centres and recommendations for best clinical practice [J]. *Eur Radiol*, 2018, 3 (4): 216-219.

[13] 江山,陈 莺,房德芳. 人参皂甙 Rh2 抗海马脑片 H₂O₂ 损伤作用及与 GABAA 受体的关系[J]. *中药药理与临床*, 2016, 6(2): 38-42.

[14] Park-JA, Kim-KW, Kim-SI. Caspase specifically cleaves p21 WAF1/CIP1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(1): 242-248.

[15] Zhu P, Hu S, Jin Q, *et al*. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway [J]. *Redox Biol*, 2018, 16(9): 157-168.

[16] Santulli G, Lewis D, des Georges A, *et al*. ryanodine receptor structure and function in health and disease [J]. *Subcell Biochem*, 2018, 87(3): 329-352.

[17] Han S, Lu Q, Wang N. Apr3 accelerates the senescence of human retinal pigment epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3121-3126.

(2018-10-11 收稿, 2018-11-13 修回)

(上接第 154 页)

[3] 曹 莹,李宁怡,任益民. 半月神经节射频热凝对复发型三叉神经痛的疗效[J]. *贵州医科大学学报*, 2015, 40 (10): 1087-1089.

[4] 康 鹏,王双义,肖文林,等. 三叉神经痛的诊断和治疗进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 12 (24): 11816-11820.

[5] 潘绵顺,李 勇,邱书珺. 三叉神经痛的发病机制及立体定向放射外科治疗进展[J]. *世界复合医学*, 2015, 1(2): 144-148.

[6] Chen G, Wang X, Wang L, *et al*. Arterial compression of nerve is the primary cause of trigeminal neuralgia[J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(1): 61-66.

[7] 王长明,关占颖,蔡长华. 经皮微球囊压迫三叉神经半月节治疗三叉神经痛的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(4): 297-300.

[8] Zhang H, Lei D, You C, *et al*. The long-term outcome predictors of pure microvascular decompression for primary trigeminal neuralgia [J]. *World Neurosurg*, 2013, 79(5-6): 756-762.

[9] 应 翔,沈煜豪,王 昊,等. 经皮穿刺微球囊压迫术治疗 80 岁以上老年病人三叉神经痛的疗效分析[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2018, 7(2): 107-111.

[10] 李在雨,罗毅男,陈云鹏,等. 三叉神经痛微球囊压迫术相关并发症的影响因素分析[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2016, 15(2): 169-170.

[11] Desouza DD, Moayed M, Chen DQ, *et al*. Sensorimotor and pain modulation brain abnormalities in trigeminal neuralgia: a paroxysmal, sensory-triggered neuropathic pain [J]. *Plos One*, 2013, 8(6): e66340-e66340.

[12] 鲍 龙,李 想,衣服新. 微血管减压术(MVD)与微球囊压迫术(PMC)治疗原发性三叉神经痛的疗效比较[J]. *辽宁医学院学报*, 2016, 37(4): 85-87.

[13] 杜垣锋,杨定博,俞文华. 经皮穿刺球囊压迫半月节治疗微血管减压术后复发性三叉神经痛[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(8): 118-120.

[14] 俞文华. 影响经皮穿刺球囊压迫术治疗三叉神经痛疗效的因素[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(21): 3379-3380.

[15] 应 翔,陈景南,陈可安. 经皮穿刺微球囊压迫三叉神经半月节治疗三叉神经痛进展[J]. *浙江临床医学*, 2017, 19 (9): 1751-1753.

(2018-11-27 收稿, 2018-12-07 修回)