

文章编号:1007-4287(2023)01-0048-05

人参二醇皂苷通过调节上皮间质转化抑制喉癌细胞的增殖和迁移

石耿隆¹,赵昀霞²,颜如玉²,孟 艳²,孙宇新^{1*},辛伟红^{1*}

(1. 吉林大学中日联谊医院 耳鼻咽喉头颈外科,吉林 长春 130033;2. 吉林大学基础医学院 病理生理学系,吉林 长春 130021)

摘要:目的 探讨人参二醇皂苷(PDS)对喉癌 Hep2 细胞增殖、迁移和上皮间质转化(EMT)的影响,并阐明其作用机制。**方法** 人喉癌 Hep2 细胞分为对照组和不同浓度的 PDS($0, 19, 38, 75, 150, 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)及地塞米松($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理组,MTT 实验检测细胞生长活力,HE 染色观察细胞形态学改变,细胞划痕实验检测细胞迁移能力,实时定量 PCR(RT-qPCR)法和 Western blotting 法检测 β -catenin、E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比,PDS 以时间及剂量依赖性抑制 Hep2 细胞生长。与对照组相比,用 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PDS 处理喉癌 Hep2 细胞 48 h 后,可与地塞米松类似的下调细胞划痕愈合率,细胞形态向上皮型转化,上皮细胞标志物 E-cadherin 上调($P < 0.05$),间充质细胞标志物 N-cadherin 和 vimentin 下调($P < 0.05$),Wnt/ β -catenin 信号通路重要蛋白 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** PDS 可通过抑制 Wnt/ β -catenin 途径,抑制 Hep2 细胞增殖、迁移和 EMT。

关键词:喉癌;人参二醇皂苷;迁移;上皮间质转化; β -catenin

中图分类号:R739.65

文献标识码:A

Panaxadiol saponins inhibits the proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells by regulating epithelial-mesenchymal transition SHI Geng-long¹, ZHAO Yun-xia², YAN Ru-yu², et al. (1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China; 2. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of panaxadiol saponins(PDS) on proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transformation(EMT) of laryngeal carcinoma Hep2 cells, and to elucidate its mechanism. **Methods** Human laryngeal carcinoma Hep2 cells were divided into control group and different concentrations of PDS($0, 19, 38, 75, 150, 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and dexamethasone($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment groups. MTT assay was used to detect the cell viability, HE staining was used to observe the cell morphological changes, cell scratch assay was used to detect the cell migration ability, real-time quantitative PCR(RT qPCR) and Western blotting method were used to detect mRNA and protein expression levels of β -catenin, E-cadherin, N-cadherin and vimentin. **Results** Compared with the control group, PDS inhibited Hep2 cell growth in a time and dose dependent manner. Compared with the control group, the laryngeal cancer Hep2 cells treated with $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PDS for 48 hours could reduce the rate of scratch healing similar to dexamethasone, the cell morphology transformed to epithelial type, the epithelial cell marker E-cadherin was up regulated($P < 0.05$), the mesenchymal cell markers N-cadherin and vimentin were down regulated($P < 0.05$), The mRNA and protein expression levels of β -catenin, an important protein of Wnt/ β - Catenin signal pathway, decreased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** PDS can inhibits Hep2 cell proliferation, migration and EMT by inhibiting Wnt/ β - Catenin pathway.

Key words: laryngeal carcinoma, panaxadiol saponins, migration, epithelial mesenchymal transition, β - catenin

(Chin J Lab Diagn, 2023, 27: 0048)

喉鳞状细胞癌占全身恶性肿瘤的 5.7%~7.6%^[1],40% 的患者在确诊时已进展至Ⅲ期或Ⅳ

基金项目:吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目(JJKH2021171KJ);吉林省科技厅科技发展计划项目(20210101258JC)

* 通讯作者

期,复发和转移是 5 年内喉癌患者死亡的主要原因^[2]。上皮间质转化(EMT)可增强细胞迁移和侵袭能力^[3]。RAS/RAF/MEK/ERK, Wnt/ β - catenin 等多种信号传导途径参与 EMT 的激活和调控^[3]。喉癌的转移与 EMT 过程有关,调节 EMT 信号传导途径是减少喉癌转移性的潜在治疗策略^[4]。人参二

醇皂苷(PDS)是从人参茎叶中提取的属于四环三萜类的原人参二醇型提取物。PDS 及其代谢产物 Rb2、Rd、F2、Rh2、Rg3、CK 和 PPD 可有效抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[5]。PDS 具有甾环结构,具有地塞米松样抗炎、抗体克作用。本研究旨在观察 PDS 对人喉癌 Hep2 细胞迁移的影响,报道如下。

1 材料和方法

1.1 细胞、主要试剂盒、仪器

人喉癌细胞系 Hep2 细胞(吉林大学基础医学院前列腺疾病预防和治疗研究中心),PDS(吉林大学自然医学研究实验室的专利产品,专利号为 ZL98100070.3),RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Clark Bioscience 公司),地塞米松(山东新华制药有限公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),二甲基亚砜、蛋白酶抑制剂(美国 Sigma 公司),逆转录试剂盒、SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒(北京宝泰克公司),BCA 蛋白质测定试剂盒(上海碧云天生物有限公司)。 β -actin、MMP2、MMP9、E-cadherin 抗体(美国 Proteintech 公司),N-cadherin、vimentin、 β -catenin 抗体(北京博奥森公司)。酶标仪(德国 Biotek 公司),CFX96 实时荧光定量 PCR 仪、蛋白电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 细胞培养

Hep2 细胞含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基中,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中常规培养。以 5×10^5 的密度将 Hep2 细胞接种于 6 孔板中,当细胞达到 70%~75% 状态时,细胞分为 3 组,分别加入 100 mg·L⁻¹ PDS(PDS 组)、100 nmol·L⁻¹ 地塞米松(DEX 组)及等量 PBS (CON 组)。48 h 后收获细胞,用于后续分析目的蛋白的 mRNA 和基因的表达水平。

1.3 MTT 实验

将 Hep2 细胞以每孔约 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,每组 5 个复孔,实验重复 3 次。当细胞生长达到 70%~75% 融合时,加入不同浓度的 PDS 溶液,继续培养 24 h 和 48 h。结束实验前每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 g·L⁻¹)孵育 4 h 后,去上清后加入 150 μ L 二甲基亚砜充分震荡溶解后,使用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度(A)值,细胞存活率=实验组 A/对照组 A × 100%。

1.4 划痕实验

将 Hep2 细胞(1×10^6 /孔)接种到 6 孔板中并保持对数生长直至生长汇合。使用 200 μ L 移液管

尖端在细胞层上划痕,PBS 洗涤后用无血清培养基培养,分别在 0 h 和 48 h 拍照记录划痕宽度。实验重复 3 次,应用 Image J 软件对划痕距离进行统计学分析,计算划痕愈合率=(0 h 划痕距离-48 h 划痕距离)/0 h 划痕距离×100%。

1.5 HE 染色和形态学分析

将载玻片置于 24 孔板中,并将细胞(1×10^4)接种在孔板中。将细胞培养 24 h 后给与相应药物处理,继续培养 48 h。用无菌 PBS 洗涤 3 次 3~5 min,用 4% 多聚甲醛固定 20~30 min,进行 HE 染色,在显微镜下观察并拍照。使用 Image J 软件进行形态学分析,计算细胞面积和周长。

1.6 实时定量 PCR

收集各组细胞后用 Trizol 试剂裂解,根据说明书制备总 RNA。应用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。使用 2×Plus SYBR qPCR Mix 进行实时荧光定量 PCR。反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min,之后 94 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环后,70 ℃ 延伸 10 min。以 GAPDH 为内参,并通过 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因相对表达水平。特异性引物序列如表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Gene	primer sequence
GAPDH	F:5' TGAGGACAGGTTCTC3' R:5' TCCACCACCTGTTGCTGA3'
β -catenin	F:5' GCAGCAACAGTCTTACCT3' R:5' ACAGGACTTGGGAGGTAT3'
Vimentin	F:5' CCAGGCAAAGCAGGAGTC3' R:5' GGGTATCAACCAGAGGGAGT3'
E-cadherin	F:5' AAGACAAAGAAGGCAAGGT-3' R:5' AGAGAGTGTATGTGGCAATG3'
N-cadherin	F:5' CAAGATGGTCAATGGAAATAG3' R:5' CTCAGGAATACGAGCCTTCAC3'

1.7 Western blotting 法

细胞用冷 PBS 洗涤后应用细胞裂解液细胞,提取各组细胞蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。加入上样缓冲液后煮沸变性 10 min,取 30 μ g 加样,通过 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,通过湿转仪器将蛋白转移至 PVDF 膜。1×TBST 溶液(含 5% 脱脂奶粉)室温封闭 1 h,加入一抗后 4 ℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次,加入二抗,1 h 后 TBST 清洗后加入 ECL 显影,凝胶成像分析仪采集图像,使用图像分析软件(IMAGE J)分析条带灰度值, β -actin 为内参,计算目的蛋白表达水平。

1.8 统计分析

各实验结果均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使

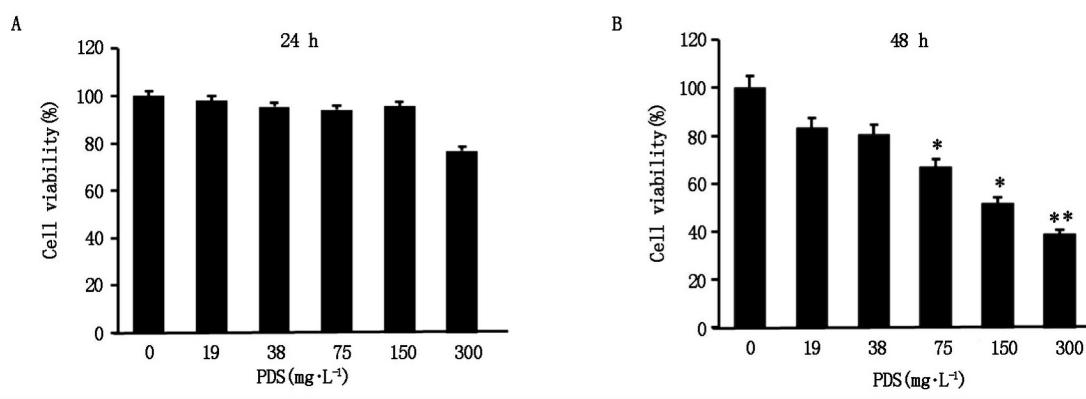
用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 使用 Student's *t*-检验比较 2 组之间的差异, 2 组以上实验采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学上意义。

2 结果

2.1 PDS 抑制喉癌 Hep2 细胞的存活率

MTT 实验检测结果发现, 各给药组与对照组

($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)相比, PDS 处理 24 h 后细胞存活率没有显著变化 ($P > 0.05$, 图 1A), 而 PDS 处理 48 h 时, 从 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始细胞存活率明显下降, 并随着剂量增加, Hep2 细胞的生长受到显著抑制 ($P < 0.05$, 图 1B)。



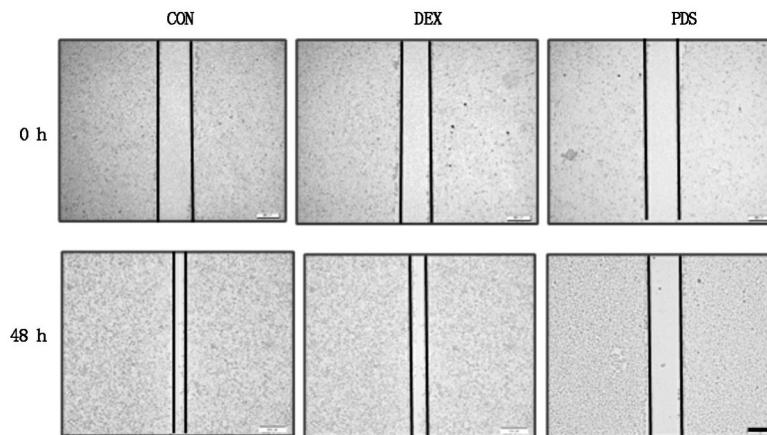
$n=3$. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

图 1 MTT 实验检测 PDS 处理 24 h(A) 和 48 h(B) 后 Hep2 细胞的存活率

2.2 PDS 抑制喉癌 Hep2 细胞的迁移

与 CON 组 ($65.7\% \pm 3.5\%$) 相比, 用 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEX ($31.6\% \pm 5.6\%$) 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

PDS ($4.3\% \pm 1.7\%$) 处理 48 h 的细胞显示更低的划痕愈合率, 明显抑制了细胞迁移能力 ($P < 0.05$, 图 2)。



CON, control; PDS, PDS group; DEX, Dexamethasone group.

图 2 划痕实验检测各组细胞的迁移能力 (Bar=200 μm)

2.3 PDS 抑制喉癌 Hep2 细胞的上皮-间质转化

HE 染色后的形态学分析显示, PDS 和地塞米松处理 48 h 后细胞的表面积和周长显著增加, 触角消失, 由纺锤形和多角形, 逐渐呈鹅卵石样形态, 存在分化成上皮细胞的趋势(图 3)。间充质细胞标志物 N-E-cadherin 和 vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而上皮细胞分化标志物 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显增加

($P < 0.05$, 图 4)。表明 PDS 具有和地塞米松一样抑制 EMT, 抑制细胞迁移的作用。

2.4 PDS 抑制 β-catenin 的表达

与 CON 组相比, PDS 组和地塞米松组 β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 并且 PDS 对 β-catenin 蛋白水平较地塞米松的影响更为明显 ($P < 0.01$, 图 5 B、C)。

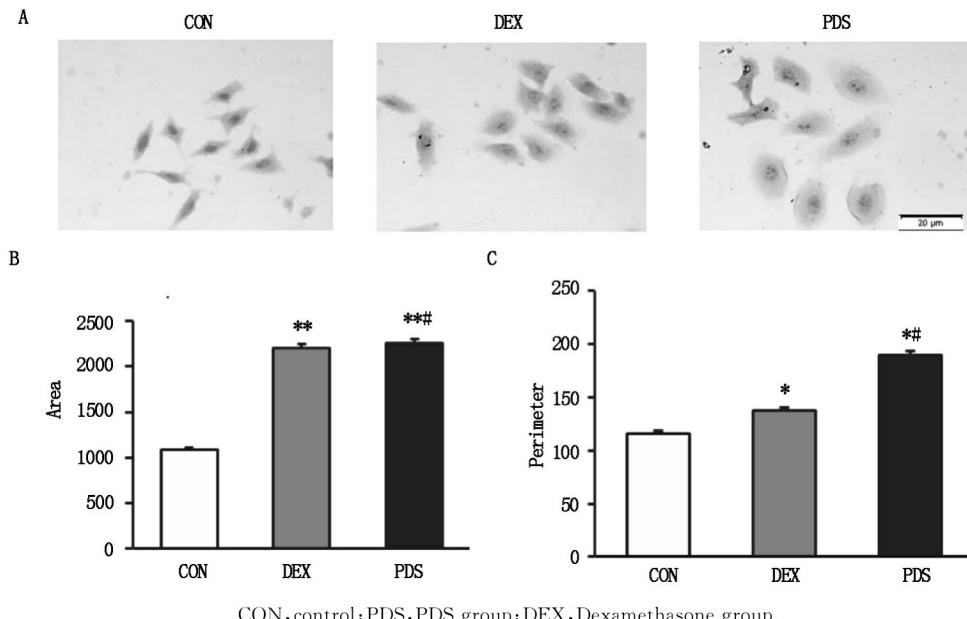
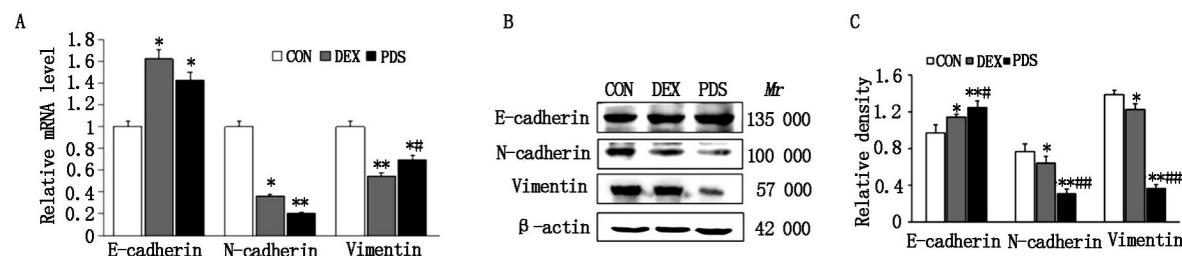
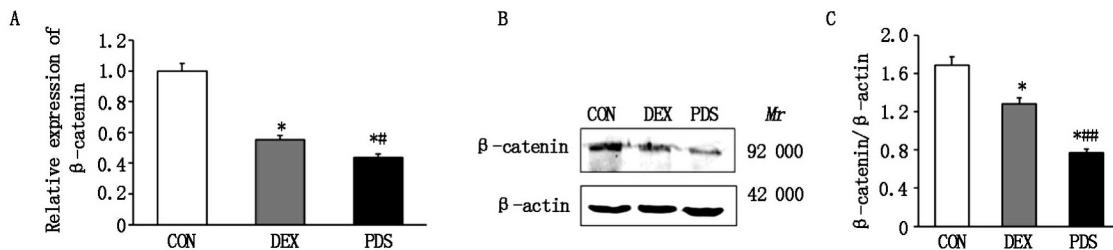


图 3 HE 染色观察各组细胞形态学(A)、细胞面积(B)和细胞周长(C)(Bar=20 μm)



$n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CON group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs DEX group. CON, control; PDS, PDS group; DEX, Dexamethasone group.

图 4 各组细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的 mRNA(A)和蛋白(B,C)表达水平(Bar=20 μm)



$n=3$. * $P<0.05$ vs CON group, # $P<0.05$; ## $P<0.01$ vs DEX group. CON, control; PDS, PDS group; DEX, Dexamethasone group.

图 5 各组细胞中 β -catenin 的 mRNA(A)、蛋白(B)表达水平和直条图(C)

3 讨论

人参、三七等中药的提取物,因其潜在的抗癌功能而受到广泛关注,Fan X 等最近研究发现人参二醇皂苷通过调节 JAK2-STAT3 信号通路,显著抑制人胰腺癌细胞系 PANC-1 和 Patu8988 的增殖并诱导细胞凋亡^[6]。Xiao S 等也发现人参二醇皂苷通过线粒体途径促进人肝细胞癌细胞凋亡^[7]。本研究选

用喉癌 Hep2 细胞,观察了 PDS 对细胞增殖和迁移的影响,发现 PDS 可以明显抑制喉癌 Hep2 细胞生长,划痕实验结果表明 PDS 处理后 48 h 细胞迁移能力受到抑制,为 PDS 在抗肿瘤临床上的应用提供了新的研究方向。

Chen XJ 等报道 PDS 可抑制 EMT, 调节细胞黏附分子和 MMPs 的表达和活性抑制肿瘤细胞侵

袭^[5]。PDS 的有效成分 Rg1 和 Rg3 可通过抑制 TGF-β1 诱导的 EMT 来抑制肝癌细胞系 HepG2 或肺癌细胞 A549 的迁移和侵袭^[8]。本研究探讨了 PDS 对 Hep2 细胞的迁移能力影响的机制。Park MT 等因为 PDS 与地塞米松的结构类似,发现其可通过糖皮质激素受体下调 MMP-9 有助于抑制 HT1080 人纤维肉瘤细胞的侵袭能力^[9]。这与本研究的 HE 染色的形态学分析结果相吻合,PDS 或地塞米松处理 48 h 后,Hep2 细胞的表面积和周长都显著增加,存在分化成上皮细胞的趋势。E-cadherin 是分布在上皮细胞表面的钙依赖性黏附分子,作为上皮细胞标志物,其功能丧失与鳞癌等的转移性传播,侵袭和预后不良有关,是 EMT 的标志之一^[10]。在本研究中,PDS 抑制 Hep2 细胞中间充质细胞标志物 N-cadherin 的表达并诱导 E-cadherin 的表达。另一种重要的间充质生物标志物是 Vimentin,其表达是上皮细胞经历 EMT 的特征^[11]。在本研究中,PDS 也明显下调了 Vimentin 在 Hep2 细胞中的表达,进一步证明了 PDS 具有地塞米松一样抑制喉癌细胞 EMT 过程的作用,进而抑制了细胞的迁移能力。

Wnt/β-catenin 被认为是 EMT 过程中最重要的信号传导途径蛋白之一。Wnt 信号通路被激活,通过切断 β-catenin 的降解途径,β-catenin 转移到细胞核中,调节下游基因 C-myc,Snail 等的表达,促进肿瘤细胞 EMT,发生转移^[12]。对天然药物成分、基因干扰等多研究显示,对 Wnt/β-catenin 途经的抑制作用可明显逆转 EMT 过程,并影响肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[13]。本研究中通过 PDS 处理观察到 Hep2 细胞对 β-catenin 信号传导的抑制作用,并在蛋白质和基因水平上得到证实。这些结果提供了 PDS 抑制 Hep2 细胞中 Wnt/β-catenin 和 TGF-β 信号传导的最新证据,这可能是 PDS 抑制 Hep2 细胞中 EMT 的主要分子机制。

总之,本研究发现 PDS 抑制 Hep2 细胞的 EMT 与迁移能力,这与抑制喉癌细胞的 Wnt/β-catenin 信号传导有关。

参考文献:

[1] Chu EA, Kim YJ. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative

- work-up[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2008, 41(4):673.
- [2] American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(22):3693.
- [3] Noubissi Nzeteu GA, Geismann C, Arlt A, et al. Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition for the Generation of Circulating Tumors Cells and Cancer Cell Dissemination[J]. Cancers(Basel), 2022, 14(22):5483.
- [4] Wang J, Wang N, Zheng Z, et al. Exosomal lncRNA HOTAIR induce macrophages to M2 polarization via PI3K/p-AKT/AKT pathway and promote EMT and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1):1208.
- [5] Chen XJ, Zhang XJ, Shui YM, et al. Anticancer Activities of Protopanaxadiol- and Protopanaxatriol-Type Ginsenosides and Their Metabolites[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016:5738694.
- [6] Fan X, Fu XT, Xie N, et al. Inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway by panaxadiol limits the progression of pancreatic cancer [J]. Aging(Albany NY), 2021, 13(19):22830.
- [7] Xiao S, Wang X, Xu L, et al. Novel panaxadiol triazole derivatives induce apoptosis in HepG-2 cells through the mitochondrial pathway[J]. Bioorg Chem, 2020, 102:104078.
- [8] Yu M, Yu XB, Guo DH, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates invasion and migration by inhibiting transforming growth factor-beta1-induced epithelial to mesenchymal transition in HepG2 cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4):3167.
- [9] Park MT, Cha HJ, Jeong JW, et al. Glucocorticoid receptor-induced down-regulation of MMP-9 by ginseng components, PD and PT contributes to inhibition of the invasive capacity of HT1080 human fibrosarcoma cells[J]. Mol Cells, 1999, 9(5):476.
- [10] Chi Y, Wang F, Zhang Y, et al. Apatinib inhibits tumour progression and promotes antitumour efficacy of cytotoxic drugs in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(7):1905.
- [11] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6):1420.
- [12] Tang Q, Chen J, Di Z, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/β-catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):232.
- [13] 李 岚,孙 莹,宋燕珂,等. PDGF-D 通过 Notch1 信号通路对肿瘤细胞上皮-间质转化调控作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(1):265.

(收稿日期:2022—07—14)