

• 中药药理 •

人参皂苷 Rg3 联合肿瘤抑素 19 肽对肝癌 HepG2 细胞 凋亡的影响及机制*

衣同辉¹ 吴艳敏¹ 刘睿² 张春晶¹ 姚淑娟¹ 师岩¹ 李淑艳^{1#}

(1 齐齐哈尔医学院医学技术学院 黑龙江 161006; 2 齐齐哈尔医学院附属第一医院)

摘要:目的 研究人参皂苷 Rg3 联合肿瘤抑素 19 肽对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响及作用机制。方法 实验为两因素两水平 2×2 析因设计,因素 A 为人参皂苷 Rg3,水平为 0 mg/L 和 40 mg/L,因素 B 为肿瘤抑素 19 肽,水平为 0 mg/L 和 200 mg/L。CCK-8 试剂盒检测肝癌 HepG2 细胞增殖情况;Hoechst33342 染色检测细胞凋亡的形态学变化;流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡率。荧光探针 JC-1 检测细胞的膜电位改变。Western blot 法检测细胞抑癌基因磷酸酶和张力蛋白同源蛋白 (PTEN)、磷酸化的磷脂酰肌醇-3 激酶 (p-PI3K) 和磷酸化的丝氨酸/苏氨酸激酶 (p-Akt) 蛋白的表达变化。天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 活性测定试剂盒检测细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性。结果 人参皂苷 Rg3、肿瘤抑素 19 肽及联合用药对 HepG2 细胞的增殖均有抑制作用,且两者具有正协同效应;CCK-8 测定人参皂苷 Rg3 的 IC_{50} 为 45.06 mg/L,肿瘤抑素 19 肽 IC_{50} 为 214.03 mg/L。Hoechst33342 染色可见 Rg3 和 19 肽单用或合用时均出现细胞凋亡,并且联合用药细胞凋亡形态变化明显。流式细胞术检测细胞凋亡趋势与 Hoechst33342 染色结果一致,联合用药凋亡率最高。荧光探针 JC-1 检测表明单用或合用时细胞膜电位下降,产生绿色荧光,联合用药产生绿色荧光最为明显。联合用药更为显著上调 PTEN 蛋白表达,下调 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达,显著增高 Caspase-3 和 Caspase-9 活性 ($P < 0.001$)。结论 人参皂苷 Rg3 和肿瘤抑素 19 肽具有抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,诱导其凋亡的作用,且两者具有正协同效应。其作用机制可能是通过 PTEN/PI3K/Akt 信号通路实现的。

关键词: 人参皂苷 Rg3; 肿瘤抑素 19 肽; 肝癌; 凋亡; PTEN /PI3K /Akt 信号通路

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2020.07.009

中图分类号: R285.5

Effects and mechanism of ginsenoside Rg3 combined with tumstatin 19 peptide on apoptosis of HepG2 cells in liver cancer*

Yi Tonghui¹, Wu Yanmin¹, Liu Rui², Zhang Chunjing¹, Yao Shujuan¹, Shi Yan¹, Li Shuyan^{1#}

(1 School of Medical Technology, Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161006, China; 2 The First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161041, China)

Abstract: Objective To study the effects and mechanism of ginsenoside Rg3 combined with tumstatin 19 peptide on apoptosis of liver cancer HepG2 cells. **Methods** The two-level factorial-analysis design was used in the experiment with factor A of ginsenoside Rg3 with two levels of 0 mg/L and 40mg/L, and factor B of tumstatin 19 peptide with two levels of 0 mg/L and 200 mg/L. The proliferation of HepG2 cells was measured by using the CCK-8 kit. Hoechst33342 staining was used to detect the morphological changes of the apoptosis of HepG2 cells. The apoptosis rates of HepG2 cells were detected with flow

衣同辉,男,博士,讲师,硕士生导师

通信作者: 李淑艳,女,博士,教授,硕士生导师,主要研究方向:小分子肽抗肿瘤机制研究, E-mail: lsy6910553@163.com

* 国家自然科学基金项目(No. 81641134) 黑龙江省教育厅基金项目(No. 2016-KYYWF-0838)

cytometry. The cell membrane potential change of HepG2 cells was measured by fluorescence probe JC-1. The expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosometen (PTEN) , phosphated phosphatidylinositol phosph atidylinositol 3-kinase (p-PI3K) and p-Akt was evaluated by using Western blot assay. The activities of caspase-3 and caspase-9 were measured with the Caspase-activity assay kit. **Results** Ginsenoside Rg3 ,tumstatin 19 peptide and the combined therapy had in hibitory effect on the proliferation of HepG2 cells. Ginsenoside Rg3 ,tumstatin 19 peptide had a positive synergistic effect. The IC₅₀ of Rg3 was 45.06 mg/L , and that of 19 peptide was 214.03mg/L. Results of Hoechst33342 staining showed that changes of apoptosis in combined therapy was more evident. The results of flow cytometry were consistent with Hoechst33342 staining , and the apoptosis rate was the highest in combined therapy. Fluorescence probe JC-1 showed that combined therapy emitted the strongest green fluorescence. The combined therapy was more significant in up-regulating the expression of PTEN protein and down-regulating the expression of p-PI3K and p-Akt protein. The activities of caspase-3 and caspase-9 enzyme were significantly increased in combined therapy ($P < 0.001$) . **Conclusion** Ginsenoside Rg3 and tumstatin 19 peptide can inhibit proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells. They manifest a positive synergistic effect. The synergistic effect might be achieved through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. **Keywords:** ginsenoside Rg3; tumstatin 19 peptide; liver cancer; apoptosis; PTEN /PI3K /Akt signaling pathway

Corresponding author: Prof. Li Shuyan , Ph. D. , Master Supervisor. 333 Bukuibei Avenue , Jianhua District , Qiqihar. Qiqihar Medical University , Heilongjiang 161006 , China. E-mail: lsy6910553@163.com

Funding: Foundation of Education Department of Heilongjiang Province (No. 2016-KYYWF-0838) ; National Natural Science Foundation of China (No. 81641134)

Conflicts of interest: None

肝癌是常见的恶性肿瘤之一,具有发病率高、预后差和病死率高等特点。据最新报道,我国每年肝癌发病人数超过 30 万,给患者的生命健康造成严重威胁^[1]。中药皂苷成分,特别是人参皂苷 Rg3(简称为 Rg3) 是人参中具有抗肿瘤活性的主要成分之一,对胃癌、乳腺癌、肺癌等具有较好的治疗作用^[2-3]。抗癌肽的研究也日益引起人们的重视^[4]。肿瘤抑素(Tumstatin) 来自胶原蛋白 IV α_3 链的非胶原区, Maeshima 等研究表明,肿瘤抑素第 185 ~ 203 位氨基酸残基组成的 19 肽具有抑制肿瘤细胞增殖和新生血管生成的作用^[5],该部分氨基酸序列称为肿瘤抑素 19 肽(简称 19 肽)。以往研究报道 Rg3 与顺铂等化疗药物联合应用,可以有效提高肿瘤患者生存期,但化疗药物顺铂还存在一系列不良反应^[6]。Rg3 与 19 肽联合应用能否发挥协同作用,在降低不良反应的同时增强抗肿瘤活性的研究尚未见报道。本文将 Rg3 与 19 肽联合应用,对肝癌 HepG2 细胞活性抑制率及凋亡的影响进行研究。

1 材料

1.1 药物与试剂

肝癌细胞株 HepG2 购自中科院上海细胞库。

人参皂苷 Rg3(北京索莱宝生物科技有限公司,批号: IG0280) ; 肿瘤抑素 19 肽(安徽国平药业有限公司,批号: GP010815) ; 胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号: 160213) ; DMEM-H 培养基(Gibco 公司,批号: 81150053) ; CCK-8 试剂盒(南京碧云天生物技术公司,批号: 20190300) ; 凋亡检测试剂盒 Muse Annexin V Dead Cell Kit(默克密理博公司,批号: 15-0180) ; GADPH 单抗、抑癌基因磷酸酶和张力蛋白同源蛋白(PTEN) 单抗、磷酸化的磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K) 单抗和磷酸化的丝氨酸/苏氨酸激酶(p-Akt) 单抗(美国 Santa Cruz 公司,批号: SC-293125 , SC-52940 , SC-6254 , SC-29123) ; Hoechst33342、JC-1 荧光染料、Caspase-3 和 Caspase-9 活性测定试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号: 20170420 20170411 20180121 2010609)。

1.2 主要仪器

Muse 细胞分析仪由默克密理博公司生产; BX63 荧光显微镜由 Olympus 公司生产; Mini Trans-Blot 转印槽和 PowerPac 通用电泳仪由 Bio-Rad 公司生产。

2 方法

2.1 Rg3 和 19 肽对肝癌细胞株 HepG2 增殖活性的影响

肝癌细胞株 HepG2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养基在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期时用 0.25% 胰酶消化,吹打成单细胞悬液后,调整细胞密度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$,每孔 100 μL 分别加入到 96 孔板中,置 37 ℃ 继续培养。镜下观察,待细胞铺满后进行实验。

Rg3 用 DMSO 溶解并进行无菌过滤,用 DMEM-H 培养基进行稀释(经预实验证明 Rg3 用 DMSO 溶解后其所含 DMSO 浓度对细胞活性无影响),19 肽用 DMEM-H 培养基溶解并进行无菌过滤。向 96 孔板相应孔中分别加入 10 μL 相应浓度的 Rg3(终浓度分别为 0、20、40、60、80、100 mg/L),每个浓度设 6 个复孔;向另外 1 块 96 孔板相应孔中分别加入 10 μL 相应浓度的 19 肽(终浓度分别为 0、100、200、300、400、500 mg/L),每个浓度设 6 个复孔,培养 24 h 后,使用 CCK-8 试剂盒测定 HepG2 细胞活力。按 20 μL /孔加入 CCK-8 检测试剂,孵育 4 h 后以 650 nm 作为参考波长,在 450 nm 测定吸光度 A,计算对 HepG2 细胞的抑制率,抑制率% = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ ($A_{\text{对照}}$ 为 0 mg/L 浓度组的平均值),计算半数抑制浓度 IC₅₀ 并筛选最佳作用浓度^[7]。以所选 Rg3 和 19 肽的最佳作用浓度按上述方法分别测定作用 12、24、48 h 对 HepG2 细胞的抑制率,选出最佳作用时间。

2.2 Rg3 联合 19 肽对肝癌细胞株 HepG2 的抑制作用测定

按上述相同的方式,实验采用两因素两水平 2 × 2 析因设计:因素 A 为 Rg3,其 2 个剂量分别为 A1 (0 mg/L) 和 A2 (40 mg/L);因素 B 为 19 肽,其 2 个剂量分别为 B1 (0 mg/L) 和 B2 (200 mg/L) (均按 2.1 结果选取)。即 A1B1 (未给药)、A2B1 (Rg3)、A1B2 (19 肽)、A2B2 (联合) 4 个组合,按上述药物浓度给药后 10 mg/L 加入相同体积 DMEM 培养基,每种组合设置 6 个复孔,继续培养 24 h,测定各孔 A 值,按上述公式计算细胞抑制率。

2.3 Hoechst33342 染色检测肝癌 HepG2 细胞凋亡的形态学变化

按 2.2 方式,细胞分为 A1B1 (未给药)、A2B1 (Rg3)、A1B2 (19 肽)、A2B2 (联合) 4 个组合,取处于对数生长期的 HepG2 细胞,用 0.25% 胰酶消化后按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,培

养 24 h 后,PBS 溶液洗涤 2 次,加入 4% 甲醛溶液于 -20 ℃ 固定 25 min,PBS 溶液洗涤 2 次并晾干后,加入 Hoechst33342 染色 10 min,PBS 溶液洗涤 3 次后以 340 nm 波长激发,荧光显微镜下观察各组合细胞形态。

2.4 HepG2 细胞凋亡的流式细胞术检测

细胞处理方式同 2.2。培养 24 h 后收集细胞,用不含胎牛血清的 DMEM 培养基按 50 μL /孔重悬。使用 Muse Annexin V Dead Cell Kit 试剂盒染色后,用 Muse 细胞分析仪进行各组合 HepG2 细胞的检测。按照试剂盒说明将双参数散点图进行分相分析,以获得各组正常细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞和坏死细胞的比例。

2.5 HepG2 细胞线粒体膜电位变化的检测

细胞处理方式同 2.2。细胞培养 24 h 后,按 500 μL /孔加入 JC-1 染色液,置于 37 ℃ 培养箱中避光孵育 20 min,PBS 清洗后用荧光显微镜观察结果。

2.6 Western blot 检测 HepG2 细胞 PTEN/PI3K/Akt 通路相关蛋白表达

细胞处理方式同 2.2。培养 24 h 后收集并裂解细胞,离心 10 min 收集上清液并检测蛋白含量,按 30 μg /孔进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜并室温封闭 2 h,加入相应稀释倍数的抗 GADPH、PTEN、p-PI3K 和 p-Akt 抗体,4 ℃ 孵育过夜,洗膜后,加入 1:5 000 的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 3.5 h,曝光胶片后用 Image J 软件进行分析,以目的蛋白灰度与 GADPH 灰度的比值(%)表示。

2.7 Rg3 联合 19 肽对 Caspase-3 和 Caspase-9 酶活性的影响

细胞处理方式同 2.2。培养 24 h 后收集细胞并加入预冷的细胞裂解液收集蛋白,取 50 μg 全细胞裂解液蛋白,按 Caspase-3 和 Caspase-9 活性测定试剂盒说明书要求分别加入 25 $\mu\text{mol/L}$ Caspases-3 底物(DEVDPNA)和 Caspase-9 底物(IETDPNA),37 ℃ 下孵育 2 h 后,使用酶标仪测定 405 nm 吸光度,做出标准曲线,回归计算 Caspase-3 和 Caspase-9 酶的水平。

2.8 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料符合正态分布者采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,析因设计的 4 个处理组及交互作用的统计分析采用 GLM → Univariate,按文献方法编程^[8]。量效关系的分析采用直线相关分析^[9],IC₅₀ 采用 Regression → Linear 求得直线回归方程并计算所得。以 $P < 0.05$

为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Rg3 和 19 肽对 HepG2 细胞增殖活性的比较

细胞在不同浓度的 Rg3 (0 ~ 100 mg/L) 和 19 肽 (0 ~ 500 mg/L) 处理 24 h 后, 细胞的增殖受到不同程度的抑制, 抑制方程分别为 $y_{Rg3} = 10.381x + 35.351$, $y_{19肽} = 11.483x + 35.351$ 。计算得 Rg3 作用 24 h 的 IC_{50} 为 45.06 mg/L, 19 肽作用 24 h 的 IC_{50} 为 214.03 mg/L。抑制作用随着药物浓度的增加而逐渐增强 (Rg3 的 $r = 0.9985$, $P < 0.01$; 19 肽的 $r = 0.9912$, $P < 0.01$)。后续药物浓度分别选取 Rg3 为 40 mg/L, 19 肽为 200 mg/L。Rg3 作用 24 h (37.31 ± 2.05) 和 48 h (36.6 ± 2.03) 的抑制率显著强于 12 h (19.57 ± 3.51 , 均 $P < 0.01$), 而作用 24 h 和 48 h 的抑制率无显著差异 ($P > 0.05$); 19 肽作用 24 h (33.05 ± 2.43) 和 48 h (33.91 ± 2.07) 的抑制率显著强于 12 h (26.5 ± 1.93 , $P < 0.01$), 而作用 24 h 和 48 h 的抑制率无显著差异 ($P > 0.05$)。故后续实验的作用时间选取 24 h。

3.2 Rg3 联合 19 肽对 HepG2 细胞增殖活性的影响

应用析因设计的方差分析显示, Rg3 和 19 肽两药具有交互效应 ($F = 57.179$, $P < 0.0001$), 表示两药合用时各自单独效应之和 ($51.55\% + 47.77\%$) / 2 比两药单用时各自单独效应之和 ($33.34\% + 29.56\%$) / 2 其抑制率提高了 18.21%, 即联合时具有正协同效应, 故此时两药的主效应检验结果已无实际意义, 需进一步分析两药的单独效应。按文献 [8] 进行编程分析后显示, Rg3 和 19 肽两药的单独效应为: 当固定 Rg3 为 0 mg/L 时, 19 肽单独效应即用 19 肽比不用其抑制率提高了 29.56% ($32.65\% - 3.09\%$), 有统计学意义 ($F = 301.129$, $P < 0.0001$); 当固定 Rg3 为 40 mg/L 时, 19 肽单独效应即用 19 肽比不用其抑制率提高了 47.77% ($84.20\% - 36.43\%$), 亦有统计学意义 ($F = 786.630$, $P < 0.0001$)。当固定 19 肽为 0 mg/L 时, Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其抑制率提高了 33.34% ($36.43\% - 3.09\%$), 有统计学意义 ($F = 383.235$, $P < 0.0001$); 当固定 19 肽为 200 mg/L 时, Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其抑制率提高了 51.55% ($84.20\% - 32.65\%$), 亦有统计学意义 ($F = 916.287$, $P < 0.0001$)。结果见表 1。

3.3 Hoechst33342 染色检测 HepG2 细胞的形态学变化

各组合的细胞培养 24 h 后在倒置显微镜下观

表 1 Rg3 联合 19 肽对 HepG2 细胞增殖活性的抑制作用比较 ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

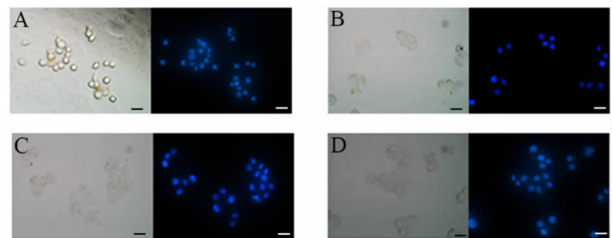
Table 1 Inhibitory effects of Rg3 combined with 19 peptide on the proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		F	P
	0	200		
0	3.09 ± 1.44	32.65 ± 2.02	301.129	< 0.0001
40	36.43 ± 3.72	84.20 ± 3.85	786.630	< 0.0001
F	383.235	916.287		
P	< 0.0001	< 0.0001	57.179*	< 0.0001 *

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。

Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

察, 可见未给药时细胞数量较多, 细胞间连接紧密, Hoechst33342 染色后观察可见细胞核大小均一。各药单用或合用 24 h 后可见细胞边界收缩变圆, 细胞核大小不一, 出现核内部分染色质断裂、皱缩, 形成团块现象, 联合用药核固缩、核碎裂细胞明显增多。见图 1。



A: 未给药; B: Rg3; C: 19 肽; D: 联合。标尺 = 50 μ m。

A: No treatment; B: Rg3; C: 19 peptide; D: Combined therapy.

Scale = 50 μ m.

图 1 HepG2 细胞的形态学改变和 Hoechst33342 染色结果 ($\times 400$)

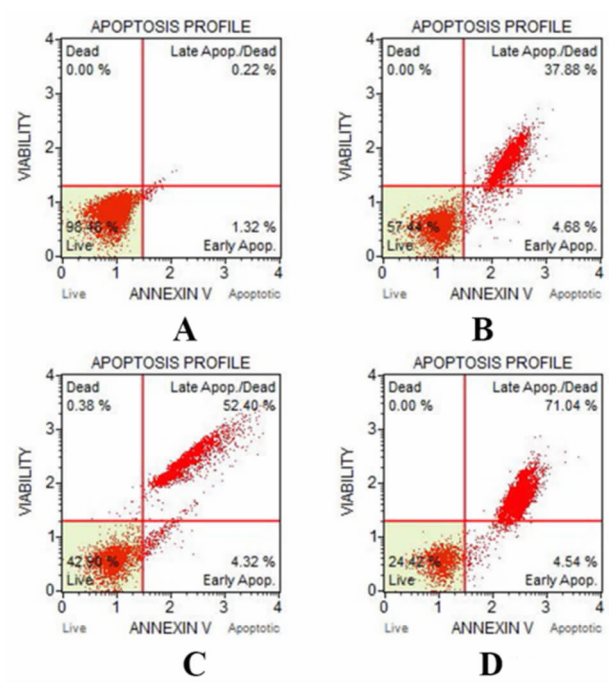
Fig. 1 Morphological changes of HepG2 cells and staining results of Hoechst33342 ($\times 400$)

3.4 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡结果

流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡结果显示: 未给药、Rg3、19 肽和联合用药的细胞凋亡率分别为 1.54%、42.56%、56.72% 和 75.58%, 见图 2。与未给药相比, Rg3、19 肽单用和合用均对 HepG2 细胞产生诱导凋亡作用。联合用药凋亡率高于单独用药, 说明联合用药能更有效促进 HepG2 细胞凋亡。

3.5 HepG2 细胞线粒体膜电位检测结果

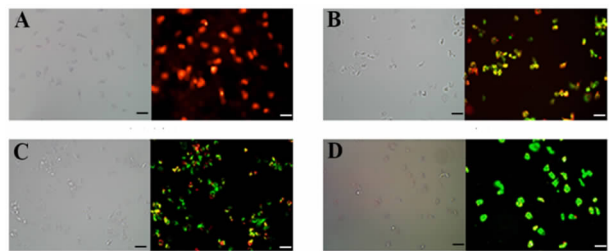
线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的重要标志。在正常的 HepG2 细胞中线粒体膜电位较高时, 聚集在线粒体基质中的 JC-1 荧光探针为二聚体, 产生红色荧光; 在 HepG2 细胞发生凋亡时, 线粒体膜电位变低, JC-1 荧光探针以单体形式存在, 产生绿色荧光。各药单用及合用均出现绿色荧光, 说明细



A: 未给药; B: Rg3; C: 19 肽; D: 联合。
A: No treatment; B: Rg3; C: 19 peptide; D: Combined therapy.

图 2 流式细胞术检测 HepG2 细胞凋亡
Fig. 2 HepG2 cells apoptosis measured with flow cytometry

胞发生了凋亡;且 Rg3 和 19 肽合用时绿色荧光所占比例较单用更大,说明细胞膜电位降低更多,细胞凋亡比例更高。见图 3。



A: 未给药; B: Rg3; C: 19 肽; D: 联合。标尺 = 50 μm。
A: No treatment; B: Rg3; C: 19 peptide; D: Combined therapy.
Scale = 50 μm.

图 3 JC-1 荧光探针检测 HepG2 细胞线粒体膜电位
Fig. 3 Mitochondrial membrane potential in HepG2 cells tested with JC-1 fluorescence probe

3.6 HepG2 细胞 PTEN /PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达

应用析因设计的方差分析方法分析 Western blot 检测结果显示:对 PTEN 蛋白表达,Rg3 和 19 肽两药具有交互效应($P=0.002$),表示两药联合时具有正协同效应。Rg3 和 19 肽两药的单独效应为:当

固定 Rg3 为 0 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达提高了 0.33,有统计学意义($P<0.0001$);当固定 Rg3 为 40 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达提高了 0.53,亦有统计学意义($P<0.0001$);当固定 19 肽为 0 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达提高了 0.04,无统计学意义($P=0.412$);当固定 19 肽为 200 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达提高了 0.24,亦有统计学意义($P<0.0001$)。结果见图 4 和表 2。

表 2 HepG2 细胞内 PTEN 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$; $n=6$)

Table 2 Changes of PTEN protein expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n=6$)				
Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		F	P
	0	200		
0	0.26 ± 0.09	0.59 ± 0.05	61.240	<0.0001
40	0.30 ± 0.06	0.83 ± 0.08	164.261	<0.0001
F	0.703	33.981	12.454*	0.002*
P	0.412	<0.0001		

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。
Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

对 PI3K 蛋白表达,Rg3 和 19 肽两药具有交互效应($P=0.001$),即两药联合时具有正协同效应。Rg3 和 19 肽两药的单独效应为:当固定 Rg3 为 0 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达降低了 0.20,有统计学意义($P<0.0001$);当固定 Rg3 为 40 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达降低了 0.05,亦有统计学意义($P=0.034$);当固定 19 肽为 0 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达降低了 0.13,有统计学意义($P=<0.0001$);当固定 19 肽为 200 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达提高了 0.02,无统计学意义($P=0.523$)。结果见表 3 和图 4。

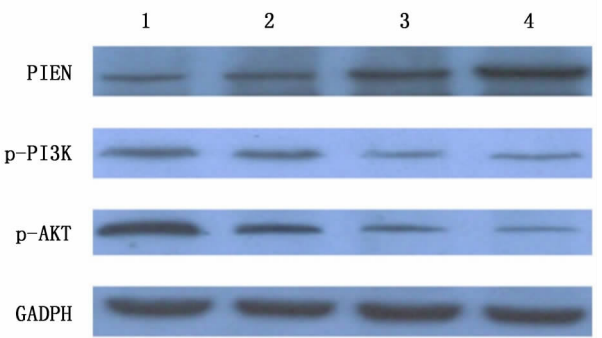
表 3 HepG2 细胞内 PI3K 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$; $n=6$)

Table 3 Changes of PI3K protein expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n=6$)				
Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		F	P
	0	200		
0	0.46 ± 0.06	0.26 ± 0.03	60.837	<0.0001
40	0.33 ± 0.06	0.28 ± 0.02	5.175	0.034
F	23.764	0.422	15.262*	0.001*
P	<0.0001	0.523		

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。
Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

对 Akt 蛋白表达,Rg3 和 19 肽两药具有交互效

应表示两药联合时具有正协同效应。Rg3 和 19 肽两药的单独效应为:当固定 Rg3 为 0 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达降低了 0.67 ,有统计学意义($P < 0.000 1$);当固定 Rg3 为 40 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其蛋白表达降低了 0.31 ,亦有统计学意义($P < 0.000 1$);当固定 19 肽为 0 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达降低了 0.44 ,有统计学意义($P < 0.000 1$);当固定 19 肽为 200 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其蛋白表达降低了 0.08 ,有统计学意义($P = 0.048$)。结果见图 4 和表 4。



1: 未给药; 2: Rg3; 3: 19 肽; 4: 联合。
1: No treatment; 2: Rg3; 3: 19 peptide; 4: Combined therapy

图 4 Rg3 19 肽及联合用药对 HepG2 细胞 PTEN / PI3K /Akt 信号通路相关蛋白表达的影响
Fig. 4 Effects of Rg3 , 19 peptide and combination therapy on expression of PTEN /PI3K /Akt pathway proteins in HepG2 cells

表 4 各组细胞内 Akt 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)
Table 4 Changes of Akt protein expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		<i>F</i>	<i>P</i>
	0	200		
0	0.98 ± 0.11	0.31 ± 0.02	375.687	<0.000 1
40	0.54 ± 0.02	0.23 ± 0.03	80.094	<0.000 1
<i>F</i>	157.224	4.434		
<i>P</i>	<0.000 1	0.048	54.425*	<0.000 1*

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。
Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

3.7 HepG2 细胞 Caspse-3 和 Caspase-9 活性的比较
应用析因设计的方差分析对 Caspase-3 和 Caspase-9 活性测得结果表明,Rg3 和 19 肽两药均具有交互效应(均 $P < 0.000 1$),表示两药联合时具有正协同效应。Rg3 和 19 肽两药的单独效应为:当固定 Rg3 为 0 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其活性提高了 0.67 和 0.65 ,有统计学意义(均

$P < 0.000 1$),当固定 Rg3 为 40 mg/L 时,19 肽单独效应即用 19 肽比不用其活性提高了 1.42 和 1.40 ,亦有统计学意义(均 $P < 0.000 1$);当固定 19 肽为 0 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用其活性提高了 0.62 和 0.60 ,有统计学意义(均 $P < 0.000 1$);当固定 19 肽为 200 mg/L 时,Rg3 单独效应即用 Rg3 比不用活性提高了 1.37 和 1.35 ,有统计学意义(均 $P < 0.000 1$)。结果见表 5 和表 6。

表 5 HepG2 细胞 Caspse-3 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)
Table 5 Activities of Caspse-3 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		<i>F</i>	<i>P</i>
	0	200		
0	0.30 ± 0.05	0.97 ± 0.05	677.342	<0.000 1
40	0.92 ± 0.03	2.34 ± 0.05	3 064.907	<0.000 1
<i>F</i>	570.447	2 832.350		
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	430.293*	<0.000 1*

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。
Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

表 6 HepG2 细胞 Caspase-9 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)
Table 6 Activities of Caspase-9 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$; $n = 6$)

Rg3 (mg/L)	19 肽 19 peptide (mg/L)		<i>F</i>	<i>P</i>
	0	200		
0	0.44 ± 0.03	1.09 ± 0.08	233.518	<0.000 1
40	1.04 ± 0.05	2.44 ± 0.10	1 069.370	<0.000 1
<i>F</i>	192.696	979.778		
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	151.727*	<0.000 1*

注: * 为 Rg3 与 19 肽的交互作用。
Note: * The interaction between Rg3 and 19 peptide.

4 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一^[10],其发病率及死亡率呈逐年上升趋势^[11]。目前对于肝癌的治疗主要以传统的放疗和化疗为主,但由于肝癌细胞对大多数的放化疗药物不敏感,导致传统疗法收效甚微^[12]。同时,国内外已研制出的众多抗肿瘤药物存在价格昂贵,在应用过程中极易出现耐药性、白细胞降低及毒副作用大等不良反应^[13-14]。因此,人们试图通过药物联合应用方式,降低药物用量、耐药性和毒副作用,改善肝癌患者的预后^[15]。

药物的联合应用是近年来提出的克服肿瘤耐药的有效策略,多种药物以不同的作用机制作用在靶细胞上,产生大于每个药物效应总和的协同效应。协同效应是确定肿瘤化疗方案的基础,既可以提高疗效,也可以降低治疗中某种药物的剂量,避免因大剂量用药引起的毒性反应。

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 是五加科多年生草本植物的干燥根,日本著名的天然药物化学家北川勋从红参中提取出人参皂苷 Rg3 (ginsenoside Rg3, G-Rg3) 活性单体,确定其化学式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$,是一种四环三萜皂苷,相对分子质量为 784.30^[16]。近年来研究发现,人参皂苷 Rg3 具有抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移,促进肿瘤细胞凋亡等显著的抗肿瘤作用^[17-19]。

肿瘤抑素(tumstatin) 来自胶原蛋白 IV α_3 链的非胶原区,是一种内源性血管生成抑制剂,能够与血管内皮细胞或肿瘤细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合,从而抑制内皮细胞增殖,促进内皮细胞凋亡,限制肿瘤的浸润、侵袭和转移,具有抑制肿瘤血管生成、控制肿瘤生长的潜力^[20-21]。但肿瘤抑素分子质量大(307.85 KD),提取、纯化、合成均较困难,且作为肺-肾出血症的自身抗原具有一定的不安全性^[22-23]。

Maeshima 等研究表明,肿瘤抑素第 185~203 位氨基酸残基组成的 19 肽具有抑制肿瘤细胞增殖和新生血管生成的作用^[5],根据氨基酸序列合成肿瘤抑素 19 肽。

目前,有报道将人参皂苷和化疗药物联合应用抗肿瘤,虽然提高了抗肿瘤效果,但化疗药物仍有一定的毒副作用^[24]。将生物活性肽与人参皂苷联用的报道较少,本研究将人参皂苷 Rg3 和肿瘤抑素 19 肽联合作用,探讨两种药物是否通过协同作用增强抗肿瘤效果,降低单独用药的剂量,减轻药物的毒副作用。

本研究 CCK8 检测结果:在 HepG2 细胞培养液中分别加入不同浓度的 Rg3(0~100 mg/L) 和 19 肽(0~500 mg/L),培养 24 h 后,随着药物浓度的增加,细胞的增殖活性被显著抑制。Rg3 的 IC_{50} 为 45.06 mg/L,19 肽 IC_{50} 为 214.03 mg/L。药物联合应用的优势是减少药物单独使用剂量,协同增大药物联合应用的效果,达到高效低毒的目的。因此,我们研究 Rg3 联合 19 肽作用效果时,选取的单个药物的作用浓度均低于各自的 IC_{50} ,即选择 40 mg/L 的 Rg3 联合 200 mg/L 的 19 肽,应用析因设计的方差分析表明,Rg3 和 19 肽两药具有交互效应,表示两药联合时通过正协同作用可以更加有效抑制 HepG2 细胞增殖。

本研究中,Hoechst33342 染色可见,Rg3 和 19 肽单用和联合用药 24 h 后细胞边界收缩变圆,细胞核大小不一,出现核内部分染色质断裂、皱缩,形成团块现象,联合用药时核固缩、核碎裂细胞明显增

多。流式细胞术分析可见,Rg3 和 19 肽联合用药时,早期凋亡和晚期凋亡细胞数量均显著高于单独用药。通过 JC-1 荧光探针检测细胞膜电位变化可反应细胞凋亡程度,在细胞发生凋亡时,线粒体膜电位变低,JC-1 荧光探针以单体形式存在,细胞激发产生绿色荧光。本研究中,联合用药绿色荧光所占比例较单独用药时更大,说明细胞膜电位降低更多,细胞凋亡比例更高。

PTEN/PI3K/Akt 信号通路在细胞周期调控方面起着重要作用。PTEN 为体内重要的抑癌基因,PTEN 蛋白在细胞凋亡、细胞增殖等过程中具有重要调控作用^[25]。PTEN 蛋白作为 PI3K 依赖 Akt 信号的负调节因子,以其脂质磷酸酶活性拮抗 PI3K 作用,使 PIP3 脱磷酸生成 PIP2,下调 PI3K/Akt 通路中 PI3K 和 Akt 蛋白的表达,上调 Akt 下游相关蛋白 Caspase 3 表达,加速细胞凋亡^[26]。

本研究中,Western blot 检测结果显示:与未给药比较,Rg3、19 肽单用及合用使 PTEN 蛋白表达均上调;且联合用药比单独用药上调作用更明显。与未给药比较,Rg3、19 肽单用及合用使 p-Akt 蛋白表达均下调,且联合用药比单独用药下调作用更明显。Caspase 活性测定结果进一步证实,Rg3 和 19 肽两者联合用药,通过正协同作用显著上调 Akt 下游凋亡效应蛋白 Caspase 3 和 Caspase 9 活性,进而加速细胞凋亡。

综上,人参皂苷 Rg3、肿瘤抑素 19 肽对 HepG2 细胞的作用具有协同效应,其机制可能是人参皂苷 Rg3 和肿瘤抑素 19 肽联合作用后,通过协同作用经 PTEN/PI3K/Akt 通路更有效地诱导 HepG2 细胞凋亡,本研究为后续的肿瘤临床药物联合治疗奠定了一定的理论基础。

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.
Sun KX, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of cancer incidence and mortality in different areas of China[J]. China Cancer, 2019, 28(1):1-11.
- [2] Nakhjavani M, Palethorpe HM, Tomita Y, et al. Stereoselective anti-cancer activities of ginsenoside Rg3 on triple negative breast cancer cell models[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(3):117-131.
- [3] 刘洋,曹雪玮,卢美雅,等. 通过细胞穿膜肽和皂苷增强一种核糖体失活蛋白抗肿瘤活性[J]. 生物技术通报, 2019, 35(8):146-154.
Liu Y, Cao XW, Lu MY, et al. Enhancement of anti-tumor effect of a ribosome-inactivating protein by cell penetrating

- peptides and saponin[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(8): 146–154.
- [4] 岳硕豪,田弛,胡元昭,等. 抗癌肽研究进展[J]. *生物技术通报* 2017, 33(11): 41–47.
Yue SH, Tian C, Hu YZ, et al. Research progress and prospects on anticancer peptides[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(11): 41–47.
- [5] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21340–21348.
- [6] Liu C, Gong Q, Chen T, et al. Treatment with 20(S)-ginsenoside Rg3 reverses multidrug resistance in A549/DDP xenograft tumors[J]. *Oncology Letters* 2018, 15(4): 4376–4382.
- [7] Lee HJ, Bao J, Miller A, et al. Structure-based discovery of novel small molecule Wnt signaling inhibitors by targeting the cysteine rich domain of Frizzled[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(51): 30596–30606.
- [8] 李悦,朱凯,俞慧强. 析因设计资料单独效应分析及其 SPSS 程序实现[J]. *中国卫生统计*, 2009, 26(6): 643–646.
Li Y, Zhu K, Yu HQ. Analysis of individual effect of factorial design data and its realization of SPSS program[J]. *Chinese Journal of Health Statistics* 2009, 26(6): 643–646.
- [9] 王丽荣,孙卫民,孙瑞元. 药剂量效相关性的显著性检验[J]. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 1996, 1(2): 146–148.
Wang LR, Sun WM, Sun RY. Significance test of drug dose-effect correlation[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1996, 1(2): 146–148.
- [10] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2010, 30(1): 3–16.
- [11] Liu YL, Wang YT, Sun XJ, et al. MiR-449a promotes liver cancer cell apoptosis by downregulation of Calpain 6 and POU2F1[J]. *Oncotarget* 2016, 7(12): 13491–13501.
- [12] Lu ZP, Zhang WY, Gao S, et al. MiR-506 suppresses liver cancer angiogenesis through targeting sphingosine kinase 1 (SPHK1) mRNA[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, 468(1–2): 8–13.
- [13] 林美凤,吴丽贤. 抗肿瘤药物的不良反应分析[J]. *中外医疗* 2018, 37(13): 114–115.
Lin MF, Wu LX. Analysis of adverse reactions of antineoplastic drugs[J]. *China & Foreign Medical Treatment*, 2018, 37(13): 114–115.
- [14] 李滢,张紫薇,李晓岩. 新生天然生物碱抗癌机制研究进展[J]. *天然产物研究与药物开发* 2016, 28(11): 1850–1855.
Li Y, Zhang ZW, Li XY. Review on anticancer mechanism of new natural alkaloids[J]. *Nat Prod Res Dev* 2016, 28(11): 1850–1855.
- [15] 隋雨桐,迟文成,姜家康. 芪杉方联合顺铂对肺癌 A549 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *北京中医药大学学报* 2018, 41(7): 553–558.
Sui YT, Chi WC, Jiang JK. Influence of Qishan Fang combined with cisplatin on PI3K/Akt signal pathway of lung cancer A549 cells[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine* 2018, 41(7): 553–558.
- [16] Kitagawa I, Yoshikawa M, Yoshihara M, et al. Chemical studies of crude drugs(1) Constituents of ginseng radix rubra[J]. *Yakugaku Zasshi*, 1983, 103(6): 612–622.
- [17] Sun MY, Ye Y, Xiao L, et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg3[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 39(3): 507–518.
- [18] 耿良,杨彩玲,田同德,等. 人参皂苷 Rg3 和 PEG-PLGA-Rg3 纳米微粒对血管内皮细胞侵袭和微管形成能力的影响[J]. *北京中医药大学学报* 2014, 37(9): 611–615.
Geng L, Yang CL, Tian TD, et al. Influences of nanoparticles Rg3 and PEG-PLGA-Rg3 on endothelial cells invasion and tube formation[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine* 2014, 37(9): 611–615.
- [19] 崔丽霞,石丹宁,焦世红,等. 基于 G 蛋白偶联雌激素受体介导的 EGFR/PI3K 途径探讨四物汤对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响[J]. *北京中医药大学学报* 2019, 42(11): 923–933.
Cui LX, Shi DN, Jiao SH, et al. Influence of Siwu Tang on proliferation of MC3T3-E1 cells based on GPER-mediated EGFR/PI3K pathway[J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 42(11): 923–933.
- [20] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin[J]. *Cancer cell*, 2003, 3(6): 589–601.
- [21] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, et al. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis[J]. *Science*, 2002, 295(5552): 140–143.
- [22] Saus J, Wieslander J, Langeveld JP, et al. Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3 (IV) chain of collagen IV[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(26): 13374–13380.
- [23] Mundel TM, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors[J]. *Microvascular Research*, 2007, 74(2/3): 85–89.
- [24] 林星,王峰,徐燕. 人参皂苷 Rg3 联合阿帕替尼促进可诱导共刺激分子(ICOS)上调的肺癌细胞免疫应答[J]. *免疫学杂志* 2019, 35(2): 137–142.
Lin X, Wang F, Xu Y. Ginsenoside Rg3 in combination with apatinib promotes inducible costimulatory molecule-upregulated cell immune response in lung cancer[J]. *Immunological Journal* 2019, 35(2): 137–142.
- [25] Zhang Z, Zheng X, Li J, et al. Overexpression of UBR5 promotes tumor growth in gallbladder cancer via PTEN/PI3K/Akt signal pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019, 120(7): 11517–11524.
- [26] McLoughlin NM, Mueller C, Grossmann TN. The therapeutic potential of PTEN modulation: targeting strategies from gene to protein[J]. *Cell Chemical Biology*, 2018, 25(1): 19–29.

(收稿日期: 2020-03-17)