

- 14 张可君, 张媛. 从活性干酵母中提取 SOD 的研究 (J). 化学工程与装备, 2014; 9(9): 30-2.
- 15 吴江, 陈代杰. 微生物中超氧化物歧化酶含量及分布 (J). 中国

医药杂志, 1997; 28(11): 495-8.

(2020-12-06 修回)

(编辑 滕欣航)

## 人参皂苷 Rg3 调控 NF- $\kappa$ B 通路抑制宫颈癌细胞增殖、转移

游可理 叶海燕 (广东省人民医院妇科, 广东 广州 510080)

**(摘要)** 目的 探讨人参皂苷 Rg3 对宫颈癌细胞体外增殖、转移能力的影响和机制。方法 采用不同浓度的 (0.00、0.12、0.24、0.48 mmol/L) 人参皂苷 Rg3 孵育宫颈癌细胞 HeLa 24 h, 采用 CCK-8 法检测 HeLa 细胞存活率, 采用 Transwell 实验检测 HeLa 细胞迁移和侵袭, 采用 Western 印迹检测 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-cadherin、波形蛋白 (Vimentin)、Toll 受体 (TLR) 4、髓样分化因子 (MyD) 88、磷酸化的核转录因子 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达。结果 人参皂苷 Rg3 (0.12、0.24、0.48 mmol/L) 处理后 HeLa 细胞存活率、迁移数、侵袭数及 N-cadherin、Vimentin、TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), E-cadherin 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖关系。结论 人参皂苷 Rg3 可抑制宫颈癌细胞的体外增殖和转移能力, 其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**(关键词)** 人参皂苷 Rg3; 宫颈癌; 迁移; 侵袭; 核转录因子  $\kappa$ B 信号通路

(中图分类号) R737.3 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202(2021)22-5078-04; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.22.060

宫颈癌是一种常见的妇科恶性肿瘤, 更是全球女性癌症相关死亡的重要原因<sup>[1]</sup>。经手术联合放疗、化疗治疗后, 早期宫颈癌患者存活率明显提高, 但复发性、转移性患者 1 年生存率仍较低<sup>[2]</sup>。因此, 迫切需要寻找一种有效抑制宫颈癌细胞增殖和转移的治疗方法。人参皂苷 Rg3 是从五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的根中提取的有效活性成分, 其通过诱导细胞凋亡, 抑制增殖、血管生成和转移, 增强免疫功能在癌症预防、治疗中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。核因子 (NF) - $\kappa$ B 被认为肿瘤转移的关键信号通路之一, 宫颈癌中 NF- $\kappa$ B 异常激活, 并促进肿瘤细胞恶性增殖和转移<sup>[4]</sup>。人参皂苷 Rg3 对宫颈癌细胞转移的研究较少, 本研究以 NF- $\kappa$ B 信号通路为切入点, 探讨人参皂苷 Rg3 对宫颈癌的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 细胞: 人宫颈癌细胞 HeLa 购于上海素尔生物科技有限公司。试剂: RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 人参皂苷 Rg3 (批号 110804-201504, 纯度 99.5%, 先用二甲亚砜溶液, 实验时用培养液稀释到所需浓度) 购于中国食品药品检定研究院; 细胞计数试剂盒 (CCK-8) 购自北京百奥莱生物公

司; Transwell 小室购自北京优尼康生物公司; 山羊抗兔 IgG (ab205718) 二抗、兔源  $\beta$ -actin 多克隆抗体 (ab8227)、兔源波形蛋白 (Vimentin) 多克隆抗体 (ab137321)、兔源 Toll 样受体 (TLR) 4 多克隆抗体 (ab13556)、兔源 MyD88 多克隆抗体 (ab2064)、山羊抗小鼠 IgG 二抗 (ab6789) 购自美国 Abcam 公司; 鼠源 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 单克隆抗体 (sc-71008)、鼠源 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 单克隆抗体 (sc-8424)、鼠源 NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体 (sc-8008)、鼠源 p-NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体 (sc-166748) 购自美国 Santa Cruz 公司。仪器: EL10A 型全自动酶标仪, 山东博科仪器公司; IX73 型奥林巴斯倒置显微镜, 上海普赫光电科技公司。

**1.2 细胞培养** HeLa 细胞采用 RPMI1640 培养基培养, 培养基中添加 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗, 置于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度的培养箱培养。细胞铺满瓶底 80% 时经胰酶消化后进行 1:4 传代培养, 每周换液 2 次, 选择第 4 代对数期细胞进行实验。

**1.3 分组** 取  $5 \times 10^3$  个 HeLa 细胞接种 96 孔板, 细胞贴壁后, 分别用含 0.00、0.12、0.24、0.48 mmol/L 人参皂苷 Rg3<sup>[5]</sup> 的培养液孵育细胞, 分别计为 Control 组、0.12 mmol/L Rg3 组、0.24 mmol/L Rg3 组、0.48 mmol/L Rg3 组。

**1.4 CCK-8 法检测 HeLa 细胞存活率<sup>[6]</sup>** 按照方法 1.3 分组, 人参皂苷 Rg3 孵育细胞 24 h, 参照文献方法检测 HeLa 细胞存活率。

**1.5 Transwell 实验检测 HeLa 细胞迁移和侵袭<sup>[7]</sup>**

基金项目: 广东省中医药局资助项目 (No. 20201002)

通信作者: 叶海燕 (1967-), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事妇科恶性肿瘤研究。

第一作者: 游可理 (1978-), 女, 主治医师, 主要从事妇科恶性肿瘤及肿瘤患者生育力保护研究。

按照方法 1.3 分组,人参皂苷 Rg3 孵育细胞 24 h,参照文献方法检测 HeLa 细胞迁移和侵袭数目。

**1.6 Western 印迹检测** E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、TLR4、MyD88、NF-κB p65、p-NF-κB p65 蛋白表达<sup>[6]</sup> 人参皂苷 Rg3 孵育 HeLa 细胞 24 h 后,RI-PA 裂解法提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后进行 SDS-PAGE,随后进行转膜。膜封闭后,分别孵育一抗和二抗。用化学发光显色试剂盒检测蛋白。采用 Image-Lab 软件分析电泳条带灰度值,以目的蛋白与 β-actin 灰度值的比值表示目的蛋白表达量。E-cadherin 和 MyD88 抗体为 1:800 稀释,N-cadherin、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB p65 抗体为 1:500 稀释,Vimentin 抗体为 1:1 500 稀释,β-actin 抗体 1:3 000 稀释,山羊抗兔 IgG 二抗 1:2 500 稀释,山羊抗鼠 IgG 二抗为 1:3 000 稀释。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS22.0 进行单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。

2 结 果

**2.1 人参皂苷 Rg3 抑制宫颈癌细胞的增殖** 与 Control 组比较,0.12 mmol/L Rg3 组、0.24 mmol/L Rg3 组、0.48 mmol/L Rg3 组 HeLa 细胞存活率均显著降低( $P<0.05$ )。随着人参皂苷 Rg3 浓度的增加其对 HeLa 细胞存活的抑制作用逐渐增强。见表 1。

**2.2 人参皂苷 Rg3 抑制宫颈癌细胞的迁移** 与 Control 组比较,0.12、0.24、0.48 mmol/L Rg3 组 HeLa 细胞迁移数显著减少( $P<0.05$ )。随着人参皂苷 Rg3 浓度的增加其对 HeLa 细胞迁移的抑制作用逐渐增强。见表 1,图 1。

**2.3 人参皂苷 Rg3 抑制宫颈癌细胞的侵袭** 与 Control 组比较,0.12、0.24、0.48 mmol/L Rg3 组 HeLa 细胞侵袭数显著减少( $P<0.05$ )。随着人参皂苷 Rg3 浓度增加其对 HeLa 细胞侵袭的抑制作用逐渐增强。见表 1,图 2。

表 1 人参皂苷 Rg3 对 HeLa 细胞存活率、迁移和侵袭及 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$   $n=3$ )

组别	细胞存活率 (%)	迁移细胞个数 (个)	侵袭细胞个数 (个)	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
对照组	100.00±7.87	137.33±8.22	106.00±10.42	0.19±0.04	0.88±0.04	0.65±0.05
0.12 mmol/L Rg3 组	77.90±7.30 <sup>1)</sup>	78.67±6.60 <sup>1)</sup>	70.33±6.94 <sup>1)</sup>	0.40±0.04 <sup>1)</sup>	0.52±0.06 <sup>1)</sup>	0.48±0.04 <sup>1)</sup>
0.24 mmol/L Rg3 组	55.23±9.55 <sup>1)2)</sup>	48.67±6.13 <sup>1)2)</sup>	53.33±7.93 <sup>1)2)</sup>	0.61±0.04 <sup>1)2)</sup>	0.27±0.03 <sup>1)2)</sup>	0.44±0.03 <sup>1)</sup>
0.48 mmol/L Rg3 组	34.30±4.75 <sup>1)2)3)</sup>	26.33±6.18 <sup>1)2)3)</sup>	26.77±6.80 <sup>1)2)3)</sup>	0.82±0.02 <sup>1)2)3)</sup>	0.21±0.04 <sup>1)2)</sup>	0.32±0.02 <sup>1)2)3)</sup>

与对照组比较:1)  $P<0.05$ ; 与 0.12 mmol/L 人参皂苷 Rg3 组比较:2)  $P<0.05$ ; 与 0.24 mmol/L 人参皂苷 Rg3 组比较:3)  $P<0.05$ ,下表同

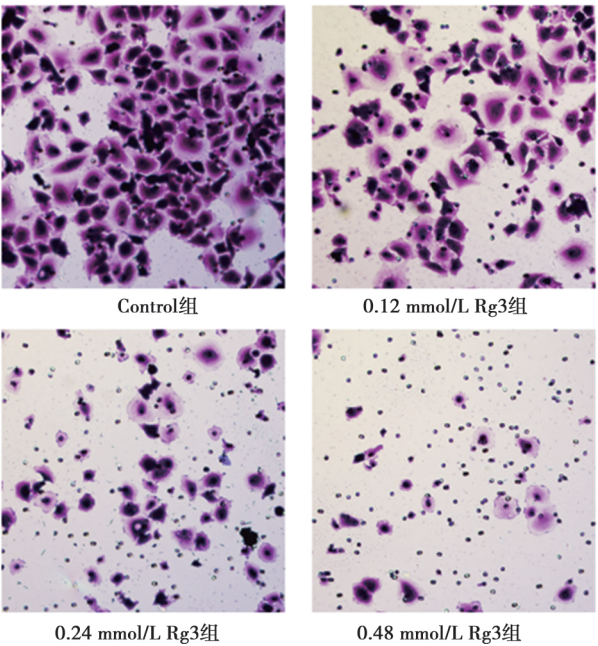


图 1 Transwell 法检测人参皂苷 Rg3 对 HeLa 细胞迁移的影响(结晶紫,×400)

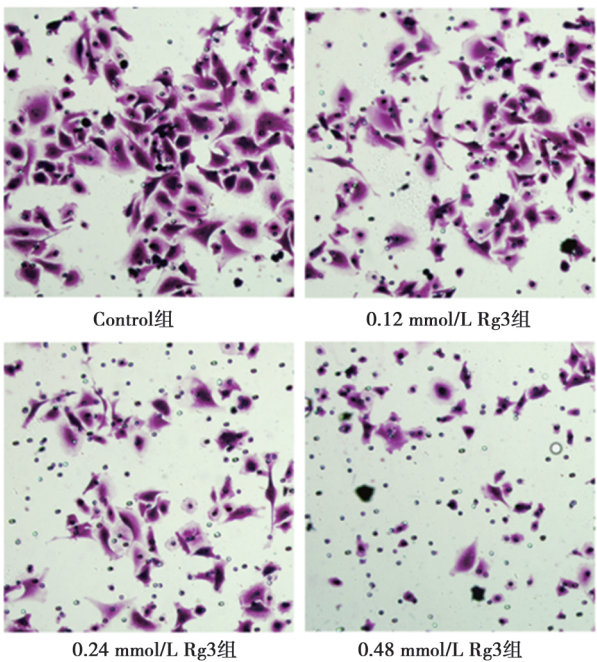
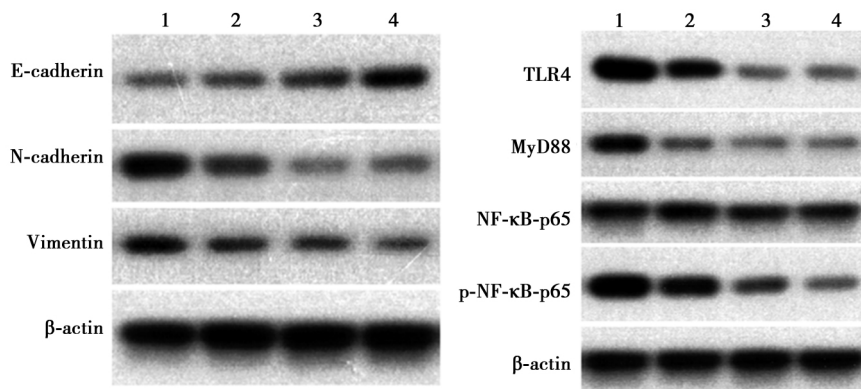


图 2 Transwell 法检测人参皂苷 Rg3 对 HeLa 细胞侵袭的影响(结晶紫,×400)

**2.4 人参皂苷 Rg3 对 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平的影响** 与 Control 组比较, 0.12 mmol/L Rg3 组、0.24 mmol/L Rg3 组、0.48 mmol/L Rg3 组 HeLa 细胞中 E-cadherin 蛋白表达显著升高, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。随着人参皂苷 Rg3 浓度的增加其对 E-cadherin 蛋白表达的促进作用以及对 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的抑制作用逐渐增强。见表

1 图 3。

**2.5 人参皂苷 Rg3 对 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响** 与 Control 组比较, 0.12 mmol/L Rg3 组、0.24 mmol/L Rg3 组、0.48 mmol/L Rg3 组 HeLa 细胞中 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ )。随人参皂苷 Rg3 浓度增加其对 TLR4、MyD88、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的抑制作用逐渐增强。见图 3 表 2。



1~4: Control 组 0.12 mmol/L Rg3 组 0.24 mmol/L Rg3 组 0.48 mmol/L Rg3 组

图 3 Western 印迹法检测人参皂苷 Rg3 对 HeLa 细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达及 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响

表 2 人参皂苷 Rg3 对 HeLa 细胞 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$   $n=3$ )

组别	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B p65	p-NF- $\kappa$ B p65
对照组	0.89 $\pm$ 0.06	0.73 $\pm$ 0.04	0.86 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.05
0.12 mmol/L Rg3 组	0.76 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.32 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	0.89 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
0.24 mmol/L Rg3 组	0.33 $\pm$ 0.03 <sup>1)2)</sup>	0.24 $\pm$ 0.02 <sup>1)2)</sup>	0.84 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>1)2)</sup>
0.48 mmol/L Rg3 组	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>1)2)</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>1)2)</sup>	0.82 $\pm$ 0.10	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>1)2)3)</sup>

### 3 讨论

人参皂苷 Rg3 已被证实在多种肿瘤中表现出抗癌活性。石燕燕等<sup>[8]</sup>报道人参皂苷 Rg3 通过阻断 PI3K/AKT 信号通路可抑制胃癌细胞增殖,并诱导其凋亡。刘军等<sup>[9]</sup>指出人参皂苷 Rg3 可能通过降低表皮生长因子受体酪氨酸激酶(EGFR-TPK)、DNA 拓扑异构酶(DNA TOP) I 活性对膀胱癌细胞侵袭、增殖和血管生成产生抑制作用。韩萍等<sup>[10]</sup>证实人参皂苷 Rg3 还可诱导结肠癌细胞凋亡,抑制其增殖和迁移。本研究表明人参皂苷 Rg3 在体外对宫颈癌细胞具有抗增殖、抗迁移和抗侵袭作用。EMT 是肿瘤转移过程中的重要事件,从表现为上皮细胞向间充质细胞表型转化,并伴随着细胞极性丧失、细胞黏附、迁移和侵袭性增加<sup>[11]</sup>。本研究发现,人参皂苷 Rg3 明显降低 HeLa 细胞中间质标志物 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达,增加上皮标志物 E-

cadherin 蛋白表达,且呈浓度依赖效应,这提示人参皂苷 Rg3 通过抑制 EMT 进而抑制宫颈癌细胞迁移和侵袭。

NF- $\kappa$ B 作为一种重要转录因子,具有广泛的细胞功能。已经证实 NF- $\kappa$ B 与宫颈癌的进展有关, NF- $\kappa$ B 异常激活可调控凋亡相关基因、细胞周期蛋白、细胞黏附基因表达,影响细胞恶性行为<sup>[12~15]</sup>。夏莹等<sup>[13]</sup>指出宫颈癌中 miR-224-5p 低表达可激活 NF- $\kappa$ B 信号传导途径诱导宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭。陈建翠等<sup>[14]</sup>报道白介素 1 受体相关激酶 1 (IRAK1) 通过介导 NF- $\kappa$ B 活化进而抑制宫颈癌细胞凋亡。陈健<sup>[15]</sup>报道抑制 NF- $\kappa$ B 激活可诱导宫颈癌细胞周期阻滞和凋亡,抑制其恶性潜能<sup>[15]</sup>。本研究表明人参皂苷 Rg3 可抑制宫颈癌中 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,这提示人参皂苷 Rg3 对宫颈癌细胞的抗增殖、抗迁移和抗侵袭作用可能是通过抑制 NF-

κB 信号途径信号通路实现的。

#### 4 参考文献

- Small W Jr ,Bacon MA ,Bajaj A *et al.* Cervical cancer: a global health crisis (J). *Cancer* 2017; 123( 13) : 2404-42.
- McClung NM ,Gargano JW ,Park IU *et al.* Estimated number of cases of high-grade cervical lesions diagnosed among women-united states , 2008 and 2016 (J). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019; 68( 15) : 337-43.
- 江昌 ,廖雨青 ,周文丽 ,等 . 人参皂苷 Rg3 的抗肿瘤作用及研究进展 (J). *临床肿瘤学杂志* 2017; 22( 7) : 664-7.
- 蔡静 ,张丹 ,张燕 . TLR4/NF-κB 表达升高促进宫颈癌增殖和转移的作用及机制 (J). *中国生育健康杂志* 2019; 30( 1) : 21-5.
- 尹天翔 ,王燕燕 . 人参皂苷 Rg3 对人肝癌细胞增殖、迁移、黏附和凋亡的影响及其作用机制 (J). *基础医学与临床* 2015; 35( 3) : 303-7.
- 冯文杏 ,周小舟 ,韩志毅 ,等 . 芪术抗癌方对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响 (J). *世界中医药* 2020; 15( 11) : 1590-2.
- 陶振洲 ,伍冀湘 ,梁杰雄 ,等 . 下调诱骗受体 3 对肝癌细胞系 HepG2 细胞生物学性状的影响 (J). *中国医药* 2017; 12( 3) : 438-41.
- 石燕燕 ,李树才 ,孙军 . 人参皂苷 Rg3 通过 PI3K/AKT 信号系统调控 CaM 基因表达促进胃癌 BGC-823 细胞的凋亡 (J). *中国肿瘤*

生物治疗杂志 2018; 25( 6) : 590-4.

- 刘军 ,徐冉 ,赵晓昆 . 探讨人参皂苷 Rg3 存在下膀胱癌细胞血管生成相关蛋白的表达与癌细胞生长和转移的关系 (J). *中药新药与临床药理* 2016; 27( 2) : 69-75.
- 韩萍 ,罗阔 ,蒋青松 ,等 . 人参皂苷 Rg3 对结肠癌 Caco-2 细胞增殖和迁移的影响 (J). *免疫学杂志* 2014; 30( 8) : 722-6.
- 刘海霞 ,陈必良 ,李佳 ,等 . EMT 参与肿瘤侵袭转移的研究进展 (J). *现代生物医学进展* 2014; 14( 14) : 2790-3.
- 陈晓红 . NF-κB 信号通路调控上皮-间质转化在宫颈癌侵袭和转移机制中的作用及意义研究 (J). *药物生物技术* 2020; 27( 2) : 45-9.
- 夏莹 ,周晓莉 ,刘杰 ,等 . miR-224-5p 靶向调控 KIF23 通过 NF-κB 信号通路影响宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭 (J). *现代肿瘤医学* 2020; 293( 11) : 39-45.
- 陈建翠 ,姜琦 . 下调 IRAK1 基因调控 NF-κB 信号通路抑制宫颈癌细胞生长的机制研究 (J). *免疫学杂志* 2019; 35( 7) : 41-6.
- 陈健 . GNA 对人宫颈癌细胞增殖抑制、凋亡、迁移及细胞周期分布的影响 (J). *现代肿瘤医学* 2020; 284( 2) : 27-32.
- 吴胜斌 ,王应灯 . 人参皂苷 20( s) -Rg3 对 LLC-pk1 细胞中顺铂所致肾毒性的保护作用 (J). *世界中医药* 2018; 13( 8) : 2010-4.

(2020-12-07 修回)

(编辑 滕欣航)

## PTEN 参与介导沉默 EN2 诱导肝癌细胞凋亡

杨启 万春 吕新远 ( 南阳市中心医院肝脏外科 河南 南阳 473000)

(摘 要) 目的 探讨磷脂酶和张力蛋白同源物( PTEN) 在沉默 EN2 诱导肝癌细胞凋亡中的作用。方法 在人肝癌细胞 HuH-7 中分别转染 EN2 siRNA、siRNA control、PTEN siRNA 和 EN2 siRNA ,用实时荧光定量-聚合酶链反应( PCR) 和 Western 印迹检测细胞中 EN2、PTEN 表达水平。四甲基偶氮唑蓝( MTT) 法检测细胞活力变化,细胞克隆实验检测细胞克隆形成能力,Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术测定细胞凋亡变化,Western 印迹检测细胞中酶切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶( Caspase) -3 和 Caspase-9 蛋白水平,JC-1 法检测细胞线粒体膜电位变化,Western 印迹检测胞质中细胞色素( Cyt) -C 蛋白水平。结果 EN2 siRNA 可以明显下调 HuH-7 细胞中 EN2 mRNA 和蛋白表达水平,siRNA control 对细胞中 EN2 mRNA 和蛋白表达水平没有影响。沉默 EN2 后的 HuH-7 细胞中的 PTEN 表达水平升高。PTEN siRNA 和 EN2 siRNA 共转染后的 HuH-7 细胞中 PTEN 表达水平较单纯转染 EN2 siRNA 的细胞明显降低。沉默 EN2 后的 HuH-7 细胞活性降低,细胞凋亡增多,并且细胞中酶切 Caspase-3 及酶切 Caspase-9 水平升高,细胞克隆形成能力也降低,线粒体膜电位明显降低,存在于胞质中的 CytC 增加。PTEN siRNA 和 EN2 siRNA 共转染后的 HuH-7 细胞与单纯转染 EN2 siRNA 的细胞比较,细胞活性升高,克隆形成能力也升高,凋亡减少,存在于胞质内的 CytC 含量降低,酶切 Caspase-3 和酶切 Caspase-9 蛋白减少,膜电位增加。结论 PTEN 参与介导沉默 EN2 诱导肝癌细胞凋亡过程,沉默 EN2 可通过促进 PTEN 表达激活线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡发生。

(关键词) 肝癌; 磷脂酶和张力蛋白同源物; 凋亡; 线粒体途径; EN2

(中图分类号) R735.7 (文献标识码) A (文章编号) 1005-9202( 2021) 22-5081-06; doi: 10. 3969/j. issn. 1005-9202. 2021. 22. 061

Engrailed-2 基因( EN2) 是存在于脊椎动物中的 EN 亚型之一,是一个较为保守的基因盒,其编码的蛋白质可同 DNA 特异性结合,调控基因的转录过

程<sup>[1]</sup>。目前很多研究表明,EN2 与多种肿瘤的发生相关,在前列腺癌等肿瘤组织中异常高表达,下调其表达水平可诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>。磷脂酶和张力蛋白同源物( PTEN) 是一种抑癌基因,其表达升高后能诱导肿瘤细胞凋亡,其作用机制与肿瘤细胞中线粒体凋亡途径被激活相关,PTEN 参与细胞内基

通信作者: 万春( 1970-) 男,博士,主任医师,主要从事肝肿瘤研究。  
第一作者: 杨启( 1982-) 男,硕士,主治医师,主要从事肝肿瘤研究。