

文章编号 1006-8147(2014)04-0271-04

论 著

人参皂苷 Rg3 调控 ERK 通路抑制 Lewis 小鼠肺癌生长的研究

董莉真, 吴志敏, 朱 泽, 李光明

(天津医科大学病原生物学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 通过人参皂苷 Rg3 对 Lewis 肺癌小鼠模型及其细胞模型的抑制研究, 探讨 ERK 信号通路及相关基因在抗肿瘤中的作用。方法: 建立 Lewis 肺癌小鼠荷瘤动物模型, 通过口饲法给予定量人参皂苷, 连续 3 周, 处死动物后, 比较各组荷瘤小鼠肿瘤体积。含药动物血清作用于 Lewis 肺癌细胞, MTT 法检测各组细胞抑制效率。Realtime-PCR 法检测荷瘤鼠 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因表达变化, Western blot 法检测荷瘤鼠 ERK、p-ERK 蛋白表达变化。结果: 人参皂苷 Rg3 对 Lewis 肺癌细胞及荷瘤小鼠的肿瘤生长均有明显抑制作用 ($P < 0.01$)。Western blot 显示 ERK 在 Rg3 处理组中的表达明显比对照组低, Realtime-PCR 结果显示, 在动物肿瘤标本中, Dusp6、Bax 基因药物处理组比对照组高表达 ($P < 0.01$), Bcl-2 基因药物处理组比对照组低表达 ($P < 0.01$)。结论: 人参皂苷 Rg3 在 Lewis 肺癌体内外模型中具有一定的肿瘤抑制效果, ERK 信号通路及 Dusp6 基因与 Rg3 的抑制作用有关, Rg3 诱导的细胞凋亡也参与了抗肿瘤的作用。

关键词 人参皂苷 Rg3; ERK; Dusp6; Lewis 肺癌; 小鼠

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

Ginsenoside Rg3 inhibitions Lewis lung carcinoma growth by mediating ERK pathway

DONG Li-zhen, WU Zhi-min, ZHU Ze, LI Guang-ming

(Department of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To discuss the ERK pathway and its relative genetic function in Lewis lung carcinoma animal and cell model through Ginsenoside Rg3 treatment. **Methods:** The Lewis lung carcinoma mice model was established, After feeding Rg3 by gavage for 3 weeks, then the volumes of the tumor were calculated. The inhibition effect on Lewis lung carcinoma cell line was detected by MTT assay. The changes in Dusp6, Bax, Bcl-2 expressions in tumor model were detected by Realtime-PCR. The changes in ERK and p-ERK protein expression were determined by Western blot. **Results:** Ginsenoside Rg3 could inhibit Lewis lung carcinoma cell and animal model ($P < 0.01$). ERK protein expression was significantly decreased in Rg3 group compared with control group by Western blot assay. Dusp6 and Bax were over expressed in Rg3 group compared with control ($P < 0.01$) while the Bcl-2 was under expressed ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ginsenoside Rg3 exhibits certain inhibition ability in both *in vivo* and *in vitro* model. ERK pathway and Dusp6 gene are associated with the Rg3 inhibition effect, and the apoptosis effect induced by Rg3 is also involved in the inhibition.

Key words Ginsenoside Rg3; ERK; Dusp6; Lewis lung carcinoma; mice

人参中提取的人参皂苷(Ginsenoside, GS)属于固醇类化合物, 种类多达 40 余种, 作用机制复杂。人参皂苷 Rg3(GS-Rg3), 学名人参二醇类四环三萜皂甙中人参皂甙, 分子式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$, 分子量为 784.30。现代研究认为, 人参皂苷 Rg3 具有多种生物活性, 为我国稀有珍贵资源, 且药用价值极高。研究表明, 其可通过抗肿瘤血管生成^[1], 诱导凋亡^[2-3]等方式发挥抗肿瘤生物功效, 对肺癌^[4]、乳腺癌^[5]、肝癌^[3]、胃癌^[2]等发展均有一定的改善作用。由于人参皂苷 Rg3 通过多途径发挥抗肿瘤效应^[6], 目前对其机制认

识尚不完善。更全面地了解人参皂苷 Rg3 的作用机制, 将对人参皂苷 Rg3 在临床实践中的应用起到积极地推动作用。肺癌成为当今中国乃至世界上恶性肿瘤中病死率最高的疾病, 我国的肺癌发病率也在持续增长。肺癌的发生和治疗都是复杂的过程, 传统的外科手术、放化疗等手段, 目前不能完全解决现有治疗问题。大多数化疗药物都具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 但化疗药物的毒副作用限制了临床的应用, 因此中药抗癌药物已备受人们的重视。细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的重要途径—Ras/Raf/Mek/Erk 信号传导通路的主要成员, 它的调控涉及细胞增殖、分化和凋亡等多种重要的细胞生物学行

基金项目 天津医科大学基金资助项目(2013KYQ13)

作者简介 董莉真(1988-), 女, 硕士在读, 研究方向: 肺癌发生的分子机制; 通信作者: 朱泽, E-mail: zhuzhe@tjmu.edu.cn, 李光明, E-mail: li-guangming@hotmail.com。

为,与肿瘤关系密切。本研究旨在探讨在 Lewis 肺癌动物和细胞模型下,人参皂苷 Rg3 对肺癌的抑制作用机制,探讨人参皂苷 Rg3 与 ERK 信号通路相关的分子信息变化,为进一步全面认识人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用和指导临床针对性治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 C57BL/6J 小鼠,雌性,体质量(20±2)g,购自中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心(SPF级,许可证号:SCXK11-00-0005),由天津医科大学动物实验中心饲养;小鼠 Lewis 肺癌细胞(由本教研室保存);人参皂苷 Rg3—参一胶囊(吉林亚泰制药有限公司);总 RNA 提取试剂盒(QIAGEN);TRIZOL (Sigma);反转录 First-Strand Synthesis 试剂盒,MTT 试剂(Invitrogen);SYBR Green PCR Mix(BIO-RAD);Bio-Rad MyIQ (美国);DMEM 培养液,胎牛血清(GIBCO);抗体 ERK,p-ERK, β -tubulin(Cell Signal Technology)。

1.2 方法

1.2.1 动物肿瘤模型的建立 脱颈处死两只 Lewis 肺癌 C57BL/6J 荷瘤小鼠,无菌环境下取新鲜瘤体组织,匀浆器内研磨,细胞计数,调节浓度至 1×10^7 个/mL,小鼠右侧腓肠肌接种 0.2 mL 细胞悬液。

1.2.2 荷瘤动物分组及用药 40 只实验小鼠分为 4 组,30 只小鼠皮下荷瘤接种,余下 10 只为正常对照组。荷瘤小鼠随机分为 3 组,第 1 组为荷瘤对照组,第 2 组为低剂量 Rg3 组,第 3 组为高剂量 Rg3 组。接种当天为第 0 天,第 2 天开始药物处理,采用灌胃法:第 1 组:0.5% NaCl 溶液 0.5 mL/d;第 2 组:每只 0.164 4 mg Rg3/d;第 3 组:每只 0.822 2 mg Rg3/d。第 22 天,处死全部实验动物,取瘤体组织,-80℃保存,备用。

1.2.3 肿瘤的体积监测 用药期间,隔天测量小鼠皮下肿瘤最大长径 a 和短径 b,瘤体体积(cm^3)= $a \times b^2/2$ 。计算各组药物的抑瘤率:抑瘤率=(1-治疗组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。

1.2.4 MTT 检测 取 5 只 C57BL/6J 小鼠,按照每只 0.822 2 mg Rg3/d,连续 5 d。最后一次给药后 2 h 处死,取血清后,-80℃保存备用。Lewis 鼠肺癌细胞接种于 96 孔板, 5×10^3 个/孔,培养 24 h 后,取上述鼠血清,分别按照含药鼠血清终浓度 0、10%、17.5%、25%添加于各孔中,培养 24 h 后,按照 MTT 试剂盒方法操作检测,各浓度重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 ERK 表达 提取冻存瘤体组织蛋白,用 Western blot 法检测 ERK、pERK 在荷瘤对照组,低剂量组,高剂量组间表达差异。设 β -

tubulin 为内参。一抗稀释度按照说明书推荐操作。ERK,1:1 000; pERK,1:1 000; β -tubulin,1:1 000。

1.2.6 Realtime-PCR 检测 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因表达 提取冻存瘤体组织 RNA,经反转录后(按试剂盒说明书操作),行 Realtime-PCR,检测 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因在对照组、低剂量组和高剂量组间的表达差异,GAPDH 为内参,每孔重复 3 次。引物设计及反应条件如下。

Bax:

Forward:5'-TAACCAAGGTGCCGGAAGTGA-3'

Reverse:5'-GGGAGGAGTCTCACCCAACCA-3'

Bcl-2:

Forward:5'-CTGCACCTGACGCCCTTCACC-3'

Reverse:5'-CACATGACCCCACCGAAGTCAA-AGA-3'

Dusp6:

Forward:5'-GAGTCTGACCTTGACCGAGACC-CCAA-3'

Reverse:5'-TTCCTCCAACACGTCCAAGTTGG-TGGAGTC-3'

GAPDH:

Forward:5'-AACGGGAAGCTTGTCATCAATG-GAAA-3'

Reverse:5'-GCATCAGCAGAGGGGGCAGAG-3'

条件:95℃,10 min;95℃,20 s;60℃,1 min,40 cycles。

1.3 统计学方法 采用 SPSS18.0 软件对数据进行分析。所有计量数据采用均数±标准差表示,图表由 Graphpad Prism 5 生成,t 检验数值为双侧, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Rg3 抑制体内 Lewis 肺癌肿瘤生长 小鼠自接种后 4 d 左右于接种处可触碰到有约 3 mm×4 mm 大小的肿瘤结节,并随时间推移而增大后肿瘤可见。从表 1 中可以看出,在连续给予 21 d 人参皂苷 Rg3 后,高、低剂量组的瘤块体积显著小于生理盐水组($P < 0.01$)。其肿瘤生长抑制率显著高于生理盐水组,高、低剂量组的体内肿瘤抑制率分别为 53.49% 和 32.23%。结果表明,人参皂苷 Rg3 对体内 Lewis 肺癌肿瘤的生长具有一定的抑制作用。

2.2 人参皂苷 Rg3 对 Lewis 肺癌细胞体外生长增殖的影响 通过 MTT 法,检测不同含药浓度的血清对 Lewis 肺癌细胞的体外抑制作用,发现,随含药血清浓度升高,肿瘤细胞生长抑制率也相应提高($P < 0.05$),如图 1 所示。说明人参皂苷 Rg3 对肿瘤细胞

的生长具有一定的抑制作用。

表1 各组 Lewis 肺癌荷瘤小鼠瘤体体积变化(cm³)

Tab 1 The volume change of Lewis lung carcinoma mice of each group (cm³)

分组	第6天	第14天	第22天	与对照组P值
对照组	0.291±0.026	1.904±0.200	4.371±0.353	—
低剂量组	0.252±0.018	1.239±0.175	2.962±0.295	<0.05
高剂量组	0.189±0.017	0.904±0.118	2.033±0.220	<0.01

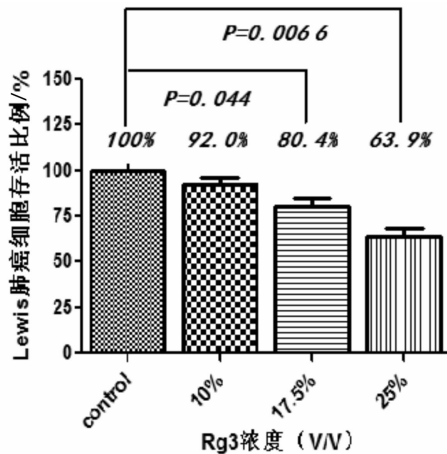


图1 人参皂苷 Rg3 对 Lewis 肺癌细胞的体外抑制作用

Fig 1 The inhibition effect of Rg3 to Lewis lung carcinoma cell line in vitro

2.3 Western blot 结果 Rg3 高剂量组和低剂量组 p-ERK 表达较对照组减弱, 且高剂量组 p-ERK 表达量较低剂量组弱, 说明随 Rg3 剂量递增 ERK 表达呈现递减(图2)。

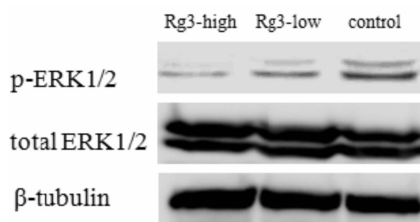


图2 Western blot 检测人参皂苷 Rg3 作用下 ERK, pERK 表达

Fig 2 The expression of ERK, p-ERK with Rg3 treatment detected by western blot

2.4 Realtime-PCR 检测 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因表达 行 Realtime-PCR 法, 检测对照组、Rg3 低剂量组、Rg3 高剂量组处理后的肿瘤标本中 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因表达, 结果如图3所示。Bax 随 Rg3 浓度增高而表达增加, 药物处理组与对照组均有显著性差异 ($P<0.01$); Bcl-2 随 Rg3 浓度增高而表达降低, 药物处理组与对照组均有显著性差异 (低剂量组, $P<0.05$; 高剂量组, $P<0.01$); Dusp6 随 Rg3 浓度增高而表达增加, 药物处理组与对照组均有显著性差异 ($P<0.01$)。说明 Rg3 的抗肿瘤作用中, 3 种基因均受

Rg3 作用而影响表达。

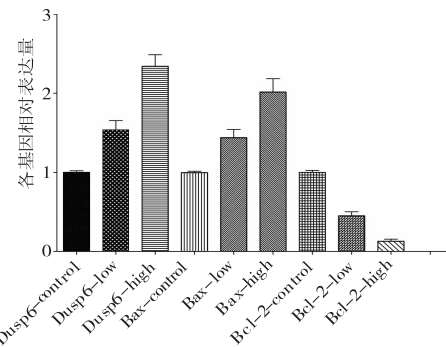


图3 Realtime-PCR 法检测 Dusp6、Bax、Bcl-2 基因表达

Fig 3 The expression of the Dusp6, Bax, Bcl-2 genes detected by Realtime-PCR

3 讨论

人参皂苷 Rg3 作为人参的重要提取物, 其抗肿瘤、提高免疫力^[7]作用已得到证实。本研究中通过将荷瘤 Lewis 肺癌小鼠模型对照组与药物组间, 肿瘤瘤体大小差异进行连续观测及比较, 显示了 Rg3 对于肺癌的抑制作用, 且不同剂量组间显示了抑制效果的差异 ($P<0.01$), 对体外肺癌细胞模型的抑制实验也得到了相同的结论。

近年来, 对人参皂苷 Rg3 的靶向性作用研究引起了广泛关注, Chen 等^[8]发现, Rg3 能够以低剂量依赖方式降低低氧状态下 Eca-109 和 786-0 两种细胞株中转录激活因子 3 (STAT3) 的磷酸化作用, 也能抑制低氧状态下 ERK 1/2 和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 的磷酸化作用, 从而抑制肿瘤细胞的增殖与生长。Choi 等^[9]发现人参皂苷 Rg3 可以通过 MEK 信号通路对人恶性胶质瘤细胞诱导凋亡作用。Ras/Raf/Mek/Erk 信号通路是由一个小 GTP 结合蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞浆蛋白激酶级联反应。MRK 磷酸化激活 ERK, 然后 ERK 磷酸化激活或失活多种靶蛋白。目前, 有关肺癌的 ERK 信号通路的特异性反馈调节机制尚未明确。本研究中发现人参皂苷 Rg3 干预下, Dusp6 的表达升高而 ERK 信号通路蛋白表达下降, 且药物组动物肿瘤体积缩小。说明了 Rg3 对 ERK 信号通路表达的抑制作用, 发现了 Dusp6 基因表达与 ERK 抑制作用相关。为进一步阐明 Rg3 作用下, 对 ERK 通路的靶向性干预机制提供了实验依据。同时, Dusp6 对 ERK 的调节作用也可望在未来作为新型的生物标记物以及治疗靶点。

Dusp6 是一种抑癌基因, 负反馈调节 ERK 信号通路。Erk1/2 的失活可由 Dusp 家族的特殊成员 Dusp6, 7, 9 和核内的 Dusp5 对“TEY 盒”的 Tyr 和

Thr 残基双特异性去磷酸化引起^[10]。Dusp 家族成员的活性可部分地由其所在胞内位置决定,如 Dusp6 主要位于细胞质中,Dusp1 主要位于细胞核中,而 Dusp16 穿梭于细胞腔隙^[11-12]。Dusp6 与肿瘤的有关研究也取得进展,Chan^[13]等在裸鼠卵巢癌的研究中发现,MKP3 蛋白的缺失与泛素/蛋白酶体降解的活性氧(ROS)有关,论证了 Dusp6/MKP3 与某些抗肿瘤药物的反应机制的关系。Zhang 等^[14]研究发现 Dusp6/MKP3 在大多数非小细胞肺癌(NSCLC)中发挥抗肿瘤作用。siRNA 抑制了 Dusp6/MKP3 的高表达,从而增强了 ERK 通路的激活,促进细胞增殖。在肺癌肿瘤及鳞状食管癌细胞标本中的研究也发现了 Dusp6 的表达与肿瘤增殖、分化、凋亡相关^[15]。本研究结果说明 Dusp6 与 ERK 之间存在着负反馈的调节作用,Rg3 通过抑制 ERK 表达,提高 Dusp6 表达,影响肿瘤的进一步发展。同时,通过对 Bax 和 Bcl-2 的表达研究发现,诱导凋亡也是 Rg3 抑制肿瘤发展的重要手段,证实了 Rg3 是多途径共同作用抑制肿瘤生长。为进一步研究 Rg3 的不同机制间是否存在协同放大效应奠定了基础。

参考文献:

- [1] Liu T G, Huang Y, Cui D D, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with gemcitabine on angiogenesis and growth of lung cancer in mice[J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 250
- [2] Kim B J, Nah S Y, Jeon J H, et al. Transient receptor potential melastatin 7 channels are involved in ginsenoside Rg3-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(4): 233
- [3] Jiang J W, Chen X M, Chen X H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibit hepatocellular carcinoma growth via intrinsic apoptotic pathway[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(31): 3605
- [4] Hu S S, Zhou L K, Ba Y, et al. A meta-analysis of ginsenoside Rg3 for non-small cell lung cancer[J]. Clin Oncol Cancer Res, 2011, 8(3): 175
- [5] Chen X P, Qian L L, Jiang H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits CXCR4 expression and related migrations in a breast cancer cell line [J]. Int J Clin Oncol, 2011, 16(5): 519
- [6] Gao J L, Lv G Y, He B C, et al. Ginseng saponin metabolite 20 (S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple Cancer signaling pathways[J]. Oncol Rep, 2013, 30(1): 292
- [7] Lu P, Su W, Miao Z H, et al. Effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on postoperative Life span of patients with non-small cell lung Cancer[J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(1): 33
- [8] Chen Q J, Zhang M Z, Wang L X. Ginsenoside Rg3 inhibits hypoxia-induced VEGF expression in human Cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26(6): 849
- [9] Choi Y J, Lee H J, Kang D W, et al. Ginsenoside Rg3 induces apoptosis in the U87MG human glioblastoma cell line through the MEK signaling pathway and reactive oxygen species[J]. Oncol Rep, 2013, 30(3): 1362
- [10] Jeffrey K L, Camps M, Rommel C, et al. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(5): 391
- [11] Wu J J, Zhang L, Bennett A M. The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(11): 4792
- [12] Masuda K, Shima H, Watanabe M, et al. MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein [J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 39002
- [13] Chan D W, Liu V W, Tsao G S, et al. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(9): 1742
- [14] Zhang Z, Kobayashi S, Boreczuk A C, et al. Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(4): 577
- [15] Ma J, Yu X, Guo L, et al. Dusp6, a tumor suppressor, is involved in differentiation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2013, 6(6): 1624

(2014-02-26 收稿)