

• 药理与临床 •

人参皂苷 Rh₂ 通过激活 GSK-3β 降解 β-catenin 发挥抗肝癌作用研究

石庆强^{1,3}, 左国伟², 冯子强³, 赵绿翠³, 李 静^{3*}, 陈地龙^{3*}

1. 重庆北部新区第一人民医院 急诊科, 重庆 401121
2. 重庆医科大学, 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016
3. 重庆医科大学, 组织学与胚胎学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

摘要: **目的** 探讨人参皂苷 Rh₂ 抗肝癌作用机制。**方法** HE 染色观察 HepG2 和 HepG2-β-catenin 荷瘤裸鼠肿瘤组织的细胞形态; 免疫组化检测 GSK-3β、β-catenin 和 MMP-3 表达; ELISA 法检测肿瘤细胞 GSK-3β 活性; PCR 检测 GSK-3β、β-catenin、Bcl-2、Cyclin D1、Bax 和 MMP-3 基因的表达; Western blotting 蛋白印迹法检测 GSK-3β 和 β-catenin 的表达。**结果** HepG2 组和 HepG2-β-catenin 组荷瘤裸鼠肿瘤细胞核成异型性, 占整个细胞比例大, 但 HepG2-β-catenin 组更明显。HepG2-β-catenin 十人参皂苷 Rh₂ 组和 HepG2 十人参皂苷 Rh₂ 组肿瘤细胞胞核固缩, 出现大量破碎细胞, 而 HepG2 十人参皂苷 Rh₂ 组肿瘤细胞核固缩及破碎细胞更明显。免疫组化结果显示人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 荷瘤裸鼠后, GSK-3β 表达增强, β-catenin、MMP-3 表达降低; HepG2 十人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin、MMP-3 表达弱于 HepG2-β-catenin 十人参皂苷 Rh₂ 组, 而 GSK-3β 表达则无明显差异。ELISA 结果显示, 人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 荷瘤裸鼠后, GSK-3β 的活性均升高。PCR 结果显示, HepG2 十人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin、Cyclin D1、Bcl-2 基因表达弱于 HepG2-β-catenin 十人参皂苷 Rh₂ 组, Bax 基因表达增强更明显, 而 GSK-3β 基因表达无明显差异。Western blotting 结果显示, HepG2 十人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin 蛋白表达弱于 HepG2-β-catenin 十人参皂苷 Rh₂ 组, 而 GSK-3β 蛋白表达无明显差异。**结论** 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌的抑制作用是通过激活 GSK-3β 降解 β-catenin 而实现的, 且能抑制肿瘤的转移。

关键词: 人参皂苷 Rh₂; HepG2; 糖原合成酶激酶-3β; β-链蛋白; 肝癌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3231-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.016

Study on anti-hepatoma effect of ginsenoside Rh₂ and mechanism of degradation of β-catenin through activating GSK-β

SHI Qing-qiang^{1,3}, ZUO Guo-wei², FENG Zi-qiang³, ZHAO Lv-cui³, LI Jing³, CHEN Di-long³

1. Department of Emergency, First People's Hospital of Chongqing New North Zone, Chongqing 401121, China
2. Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the anticancer effect and the mechanism of ginsenoside Rh₂ on animal model of HepG2 liver carcinoma. **Methods** HE staining was used to observe cell morphology. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of GSK-3β, β-catenin, and MMP-3 in isolated single cells. The activity of GSK-3β was checked by ELISA kit. The expression levels of GSK-3β, β-catenin, Bax, Bcl-2, CyclinD1, and MMP-3 genes were measured by qRT-PCR. The expression of β-catenin and GSK-3β proteins were determined by Western blotting. **Results** HE staining showed that the nucleus was atypia and account for a large proportion of the whole cell in HepG2 group and HepG2-β-catenin group. But nucleus atypia in HepG2-β-catenin group was more obvious. Condensation nuclei and a lot of broken cells were observed in HepG2-β-catenin + ginsenoside Rh₂ group and

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271368); 重庆市教委基金项目 (KJ110308)

作者简介: 石庆强 (1986—), 男, 四川人, 医师, 硕士, 主要从事人参对肿瘤的抑制作用研究。Tel: 13696470776 E-mail: 569770664@qq.com

*通信作者 陈地龙 (1971—), 男, 博士, 研究员, 主要从事中药对肿瘤的抑制作用研究。Tel: (023)58556801 E-mail: chendilong@21cn.com

李 静 (1972—), 女, 博士, 副教授, 主要从事中药对肿瘤的抑制作用研究。Tel: (023)58556801 E-mail: lijingyangyang@126.com.cn

HepG2 + ginsenoside Rh₂ group. However, condensation nuclei and broken cells in HepG2 + ginsenoside Rh₂ group were more obvious. Immunohistochemical results indicated the expression of GSK-3 β increased, while β -catenin and MMP-3 expression decreased in HepG2- β -catenin + ginsenoside Rh₂ group, compared with HepG2- β -catenin group. The expression of β -catenin and MMP-3 in HepG2 + ginsenoside Rh₂ group was lower than that in HepG2- β -catenin + ginsenoside Rh₂ group, while GSK-3 β was no significant difference. The ELISA results indicated that the activity of GSK-3 β was increased in HepG2 + ginsenoside Rh₂ group and HepG2- β -catenin + ginsenoside Rh₂ group. Compared with HepG2- β -catenin + ginsenoside Rh₂ group, the expression of Bax gene in HepG2 + ginsenoside Rh₂ group increased significantly, and the expression levels of Bcl-2, CyclinD1, and MMP-3 genes were also significantly lower, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with HepG2- β -catenin + ginsenoside Rh₂ group, the expression of β -catenin protein in HepG2 + ginsenoside Rh₂ group was also significantly lower, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** *In vivo* experiment shows that weight of tumor is decreased by ginsenoside Rh₂ through activating GSK-3 β to degrade β -catenin and could inhibit the ability of HepG2 cells metastasis.

Key words: ginsenoside Rh₂; HepG2; glycogen synthase kinase-3 β ; β -catenin; liver carcinoma

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其严重危害人类健康,易于肝内转移及向肺、骨、肾、脑转移。尽管临床上在诊断和治疗方面取得很大进步,但肝癌仍是癌症相关死亡的全球第三大原因^[1-2]。随着介入治疗的发展,使得化疗药物可以直接作用于肝癌细胞,部分患者的寿命得以延长^[3-4]。然而,有的肝癌患者对化疗不敏感,容易产生耐药,对于这部分患者来说,目前尚缺乏有效的治疗方法。因此,寻求有效的药物来提高化学疗法的效果是目前研究的焦点。

人参皂苷 Rh₂ 是从人参中提取的天然活性成分,研究表明其能在多个环节上抑制多种肿瘤细胞的增殖、促进肿瘤细胞凋亡等^[5-6],越来越多的研究显示,治疗肝癌时人参成为备选药物之一,人参的化学预防和抗癌作用是通过损伤 DNA、诱导细胞凋亡和增殖抑制及免疫调节来实现的^[7-8]。研究显示,人参皂苷 Rh₂ 诱导肝癌细胞后,可以使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期^[9-12],前期研究也发现人参皂苷 Rh₂ 可抑制肝癌细胞的增殖并诱导其凋亡,且呈浓度和时间依赖^[13]。

Wnt 信号通路的异常激活同多种恶性肿瘤如结、直肠癌,肝癌,乳腺癌,前列腺癌等有关^[14]。 β -链蛋白(β -catenin)作为 Wnt 通路中重要的信号传递因子参与调节细胞的生长和增殖,研究发现,肝癌细胞中 β -catenin 蛋白的表达水平明显高于癌旁组织,同时 β -catenin 对抗癌药物有抵抗作用。 β -catenin 在正常组织及癌组织中作为一个重要的分子,它的稳定性依赖于由 axin、结肠腺瘤样息肉基因(adenomatous polyposis coli, APC)和糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)构成的降解复合物, β -catenin 在细胞内的表达水平主要由 GSK-3 β 调节^[15]。Tsuchiya 等^[16]在结肠癌细胞中发现 GSK-3 β 可通过降解 β -catenin 来抑制结肠

癌细胞的生长。有研究表明,在实体肿瘤的化疗时,化疗药物的敏感性和耐药性与 GSK-3 β 活性相关。Page 等^[4]研究发现,肝癌细胞中 GSK-3 β 蛋白的表达水平明显低于正常肝组织及癌旁组织,而且低表达的 GSK-3 β 临床病理特征预示着预后不良。故 GSK-3 β 可作为一个潜在抗癌的靶点。本研究采用 4 周龄的 Balb/c 裸小鼠,在其臀部分别接种 HepG2 和 HepG2- β -catenin 细胞,成功构建肝癌动物模型,考察人参皂苷 Rh₂ 对肝癌裸鼠肿瘤生长的影响,并通过 HE 染色观察肿瘤细胞核的形态,采用 ELISA、qRT-PCR、Western blotting 等方法考察人参皂苷 Rh₂ 对 GSK-3 β 的激活作用以及 β -catenin 下游基因的变化,进一步探讨人参皂苷 Rh₂ 的抗肝癌作用及与 Wnt 信号通路相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及主要仪器

人参皂苷 Rh₂ (质量分数 98%,批号 111748) 购于国家标准物质网;DMEM-F12 培养基、Hyclone 血清、嘌呤霉素购于美国 Hyclone 公司;人肝癌细胞 HepG2 株,由重庆医科大学临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室左国伟教授提供;pLOV-EF1a-MCS-3FLAG 质粒(re-expression β 联蛋白慢病毒质粒及空质粒)及 293T 慢病毒包装细胞由上海纽恩生物科技公司提供;Balb/c 裸鼠为雌性,4 周龄,购于重庆医科大学动物中心,许可证号 SYXK(渝)2012-0001;GSK-3 β 试剂盒购于美国 Cell Signaling Technology; β -actin 抗体,北京中衫金桥公司; β -catenin、GSK-3 β 、基质金属蛋白酶-3(MMP-3)抗体购于美国 Cell Signaling Technology;倒置显微镜购于日本 Olympus 公司;PCR 仪器购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养、感染及筛选

HepG2 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM-F12 培养液培养, 2~3 d 传代 1 次。上海纽恩生物科技有限公司提供的感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 为 20。用 CCK8 筛选嘌呤霉素工作质量浓度为 0.5 g/L。取 2 个一次性无菌瓶, 分别接种 2×10^8 个/L 细胞。37 °C 恒温培养 24 h, 取上述细胞瓶, 弃去培养基, 其中一瓶中加入 β -catenin 慢病毒颗粒 50 μ L 及 4 g/L 的 Polybrene 1 μ L, 而另一瓶继续原条件下培养。感染 24 h 后, 用倒置荧光显微镜观察感染效果, HepG2- β -catenin 感染细胞呈绿色荧光, 弃去培养基, 加入含有嘌呤霉素 0.5 g/L 的 DMEM-F12 培养液进行筛选, 获得稳定感染的 HepG2- β -catenin 细胞。HepG2- β -catenin 细胞接种在含嘌呤霉素 0.5 g/L 的 DMEM-F12 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度下常规培养, 48~72 h 传代 1 次。

1.3 肝癌动物模型构建

分别用 HepG2、HepG2- β -catenin 细胞 (5×10^7 个, 约 0.1 mL)、生理盐水接种到 4 周龄的 Balb/c 裸小鼠左臀处, 实验分为 5 组: HepG2- β -catenin 组、HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 组、HepG2 组、HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组、对照 (生理盐水) 组。荷瘤直径长至约 0.5 cm 后, 人参皂苷 Rh₂ 组每天 ig 给予人参皂苷 Rh₂ 20 mg/kg (相当于人用剂量 1.6 mg/kg), 其他各组 ig 生理盐水, 每天 1 次, 连续 20 d。每天测瘤体的直径及小鼠体质量, 20 d 后处死, 取瘤体组织称质量, -80 °C 冻存。

1.4 HE 染色观察细胞核的形态

用刀片切取部分瘤体, 用 4% 多聚甲醛固定, 用石蜡包埋, 制备 4 μ m 切片, 采用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇至水洗, 苏木素染色 5 min, 自来水冲洗。吸干水后在盐酸乙醇提插数下, 在自来水浸泡 15 min, 吸干水后置入伊红液 2 min, 脱水, 透明, 封片, 中性树脂封固。

1.5 免疫组化检测肿瘤组织中 GSK- β 、 β -catenin 和 MMP-3 表达

取各组已制作好的石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 抗原修复, 加适量内源性过氧化物酶阻断剂, 加一抗 GSK- β (1:200)、 β -catenin (1:200)、MMP-3 (1:200), 加辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, 滴加适量配好的 DAB 显色剂; 苏木精复染 10~30 s, 脱水、透明、封片。

1.6 ELISA 法检测肿瘤组织中 GSK-3 β 酶活性

取 HepG2- β -catenin 组、HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 组、HepG2 组、HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组的瘤体组织提取总蛋白, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 最后用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (A) 值, 根据标准曲线计算 GSK-3 β 活性。

1.7 qRT-PCR 法检测瘤体组织中 GSK-3 β 、 β -catenin、Bcl-2、Cyclin D1、Bax、MMP-3 基因的表达

取 HepG2- β -catenin 组、HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 组、HepG2 组、HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组的瘤体组织, 依据说明书提取总的 RNA, 用计算机测出 RNA 浓度, 逆转录成 cDNA, 进行定量分析。引物如下: β -actin 正向引物 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3', 反向引物 5'-CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG-3'; β -catenin 正向引物 5'-CGGGACCGCGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3', 反向引物 5'-TAATACGACTCACTAGAGGG-3'; GSK-3 β 正向引物 5'-GGATTCGTCAGGAACAGGACA-3', 反向引物 5'-TTAGCATCTGACGCTGCTGT-3'; Bcl-2 正向引物 5'-GGTGAAGTGGGGGAGGATG-3', 反向引物 5'-GGCAGGCATGTTGACTTAC-3'; Cyclin D1 正向引物 5'-CATGGAGAGACAGACAGAGCA-3', 反向引物 5'-TATCCACGGGGC-TGTTTCTA-3'; Bax 正向引物 5'-TTCATCCAGGATCGAGCAGG-3', 反向引物 5'-CTTGGTGGACGCATCCTGAG-3'; MMP-3 正向引物 5'-TAATGGAGATGCCACTTTGATG-3', 反向引物 5'-GAGTGAAAGAGACCCAGGGAGTG-3'。PCR 反应条件: PCR Master Mix (2 \times) 12.5 μ L、正向引物 1 μ L、反向引物 1 μ L、模板 cDNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。选择程序: 94 °C、30 s; 72 °C、60 s; 30 个循环, 72 °C, 5 min, 4 °C ∞ 。

1.8 Western blotting 法检测瘤体组织中 GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白的表达

取 HepG2- β -catenin 组、HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 组、HepG2 组、HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组的瘤体组织提取蛋白, 测蛋白浓度, 并使蛋白变性。配制胶体, 电泳, 电转, 结束后, 将膜取出并放在 5% 牛奶封闭液中室温封闭 1.5 h; 4 °C 下与兔抗人抗体 GSK-3 β (1:1 000)、 β -catenin (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Cyclin D1 (1:1 000)、Bax (1:1 000)、MMP-3 (1:500), 鼠抗人 β -actin (1:1 000) 孵育 16 h; TBST 溶液漂洗 1 h, 加入辣根过氧化物酶

标记山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG (1 : 1 000), 常温孵育 1.5 h, 再用 TBST 漂洗 1 h, 加入显色剂 ECL 试剂显色后曝光。

1.9 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析多组间的比较, 采用 LSD 检验分析两两之间的比较。

2 结果

2.1 获得 HepG2-β-catenin 细胞

用 pLOV-EF1a-MCS-3FLAG-β-catenin 慢病毒去感染 HepG2 细胞, 感染成功的 HepG2 细胞命名为 HepG2-β-catenin, 通过荧光显微镜观察, 细胞中可见大量绿色荧光; 而 HepG2 细胞中无荧光(图 1)。用流式细胞仪检测细胞 β-catenin 感染率, 第 2 天的

感染率为 94.08%, 第 3 天的感染率为 99.49%(图 2)。用 qRT-PCR 法检测 HepG2 和 HepG2-β-catenin 细胞中 β-catenin 基因的表达, 与 HepG2 细胞相比, 随着时间延长, HepG2-β-catenin 细胞中 β-catenin 基因的表达明显升高(图 2)。

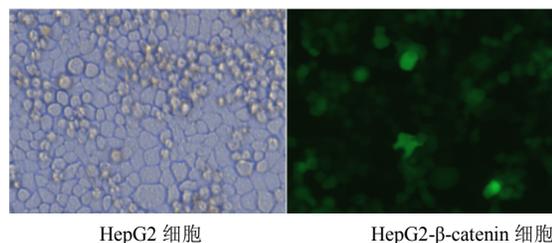


图 1 荧光显微镜下观察 HepG2 和 HepG2-β-catenin 细胞
Fig. 1 HepG2 and HepG2-β-catenin cells observed by fluorescence microscopy

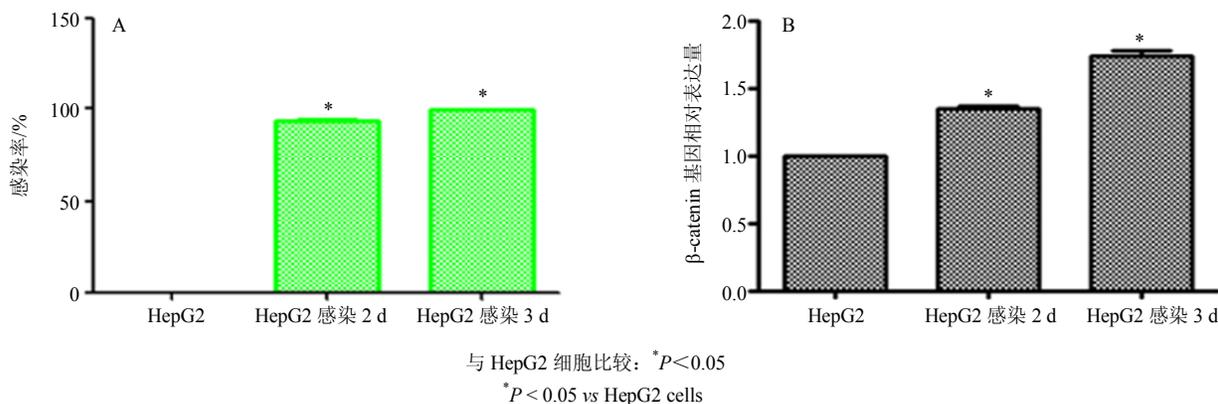


图 2 流式细胞仪检测的 HepG2 细胞 β-catenin 感染率 (A) 和 qRT-PCR 法检测的 HepG2 细胞中 β-catenin 的表达 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Rate of β-catenin infection in HepG2 cells analyzed by flow cytometry (A) and expression of β-catenin gene in HepG2 and HepG2-β-catenin measured by qRT-PCR (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤质量的影响

造模的 4 组小鼠, 每组 5 只, 摘取瘤体后称质量。HepG2-β-catenin 组小鼠瘤质量 (1.70 ± 0.19) g 大于 HepG2 组 (1.60 ± 0.16)g, 差异显著 (P < 0.01); HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂ 组瘤质量 (1.10 ± 0.12) g 大于 HepG2 + 人参皂苷 Rh₂ 组 (1.00 ± 0.13) g, 差异显著 (P < 0.01)。

2.3 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤体组织细胞核的影响

HE 染色结果显示, HepG2 组和 HepG2-β-catenin 组中细胞核成异性性, 占整个细胞比例大, 但 HepG2-β-catenin 组更明显。HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂ 和 HepG2 + 人参皂苷 Rh₂ 组中细胞胞核固缩, 并出现大量破碎细胞, 而 HepG2 + 人参皂苷

Rh₂ 组细胞胞核固缩及破碎细胞更明显, 见图 3。

2.4 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤体组织中 β-catenin、Gsk-3β 和 MMP-3 表达的影响

免疫组化结果显示, 人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 组荷瘤裸鼠后, 瘤体组织中 GSK-3β 表达增强, β-catenin、MMP-3 表达降低。HepG2 + 人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin、MMP-3 表达弱于 HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂ 组, 而 GSK-3β 表达无明显差异, 见图 4。

2.5 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤体组织中 GSK-3β 酶活性的影响。

ELISA 结果显示, 人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 组荷瘤裸鼠后, 肿瘤组织中 GSK-3β 酶的活性均升高, 见图 5。

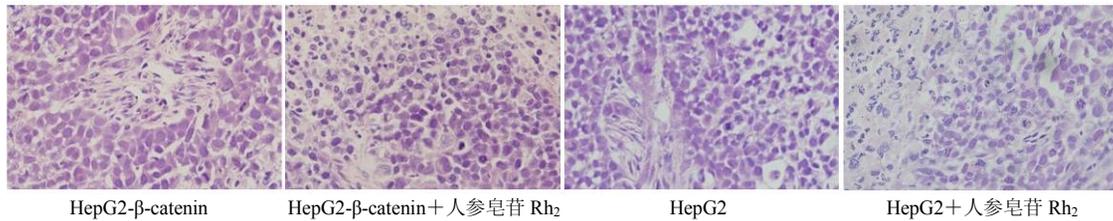


图 3 各组裸鼠肿瘤组织细胞核形态变化

Fig. 3 Morphological changes of nucleus of tumor cells of nude mice in each group

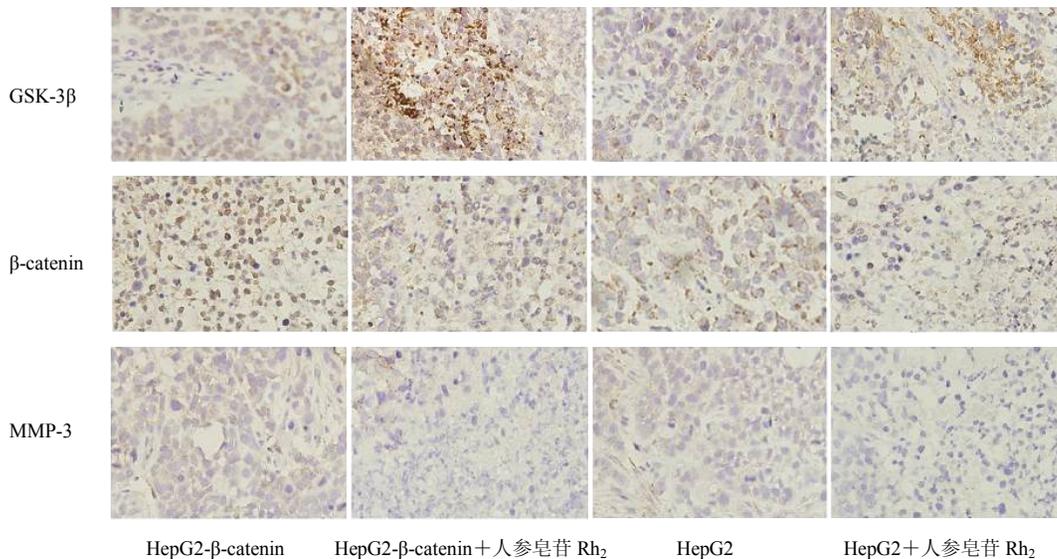
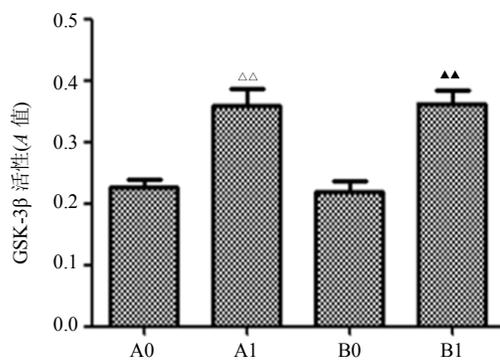


图 4 各组裸鼠肿瘤组织中 GSK-3β、β-catenin 和 MMP-3 的阳性表达 (免疫组化)

Fig. 4 Positive expression of GSK-3β, β-catenin, and MMP-3 in isolated single cells of nude mice in each group (immunohistochemical staining)



A0-HepG2-β-catenin A1-HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂
 B0-HepG2 B1-HepG2 + 人参皂苷 Rh₂; 与 A0 组比较: ^{△△}*P* < 0.01;
 与 B0 组比较: ^{△△}*P* < 0.01, 下同
 A0-HepG2-β-catenin A1-HepG2-β-catenin + ginsenoside Rh₂
 B0-HepG2 B1-HepG2 + ginsenoside Rh₂; ^{△△}*P* < 0.01 vs A0 group;
^{△△}*P* < 0.01 vs B0 group, same as below

图 5 各组裸鼠瘤体组织中 GSK-3β 酶活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 5 Activity of GSK-3β in tumor tissue of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤体组织中 GSK-3β、β-catenin、Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 基因表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 组荷瘤裸鼠后, 肿瘤组织中 GSK-3β、Bax 基因表达上调, β-catenin、Cyclin D1、Bcl-2、MMP-3 基因表达下调。但 HepG2 + 人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin、Cyclin D1、Bcl-2 的表达弱于 HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂ 组, Bax 基因表达上调更明显, 而 GSK-3β 表达无明显差异, 见图 6。

2.7 人参皂苷 Rh₂ 对肝癌模型小鼠瘤体组织中 GSK-3β、β-catenin 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 人参皂苷 Rh₂ 诱导 HepG2 及 HepG2-β-catenin 组荷瘤裸鼠后, 肿瘤组织中 GSK-3β 蛋白表达增强, β-catenin 蛋白表达降低。但 HepG2 + 人参皂苷 Rh₂ 组中 β-catenin 蛋白表达弱于 HepG2-β-catenin + 人参皂苷 Rh₂ 组, 而 GSK-3β 蛋白表达无明显差异, 见图 7。

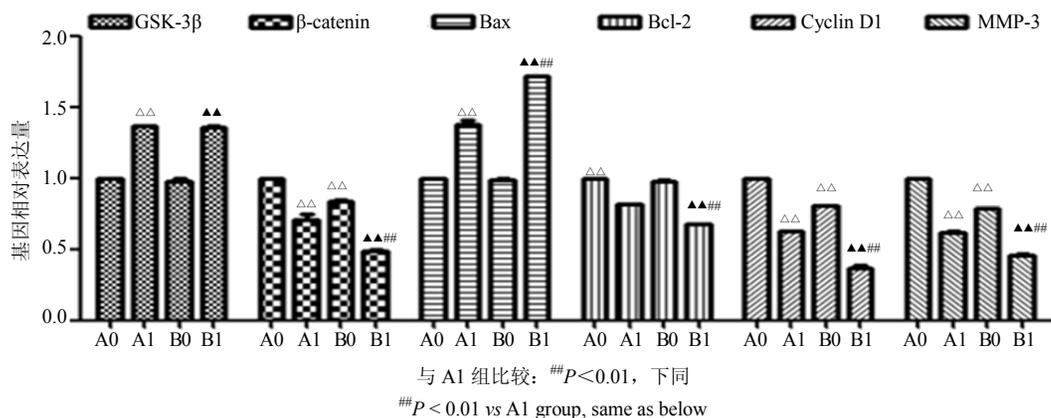


图 6 各组裸鼠瘤体组织中 GSK-3β、β-catenin、Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Expression of GSK-3β, β-catenin, Bax, Bcl-2, Cyclin D1, and MMP-3 genes in tumor tissue of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

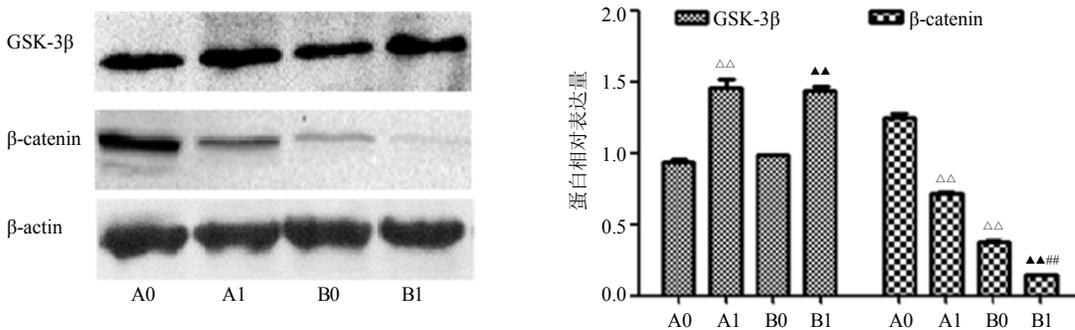


图 7 各组裸鼠瘤体组织中 GSK-3β 和 β-catenin 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Expression of GSK-3β and β-catenin protein in tumor tissue of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

人参作为我国传统中药已有上千年的历史，近年来提出其有效成分用于多种肿瘤的预防和治疗^[5,7,9-10]。大量研究表明人参皂苷 Rh₂ 可显著影响并诱导胰腺癌细胞、肝癌细胞和肺癌细胞 A549 的凋亡^[11]。人参皂苷 Rh₂ 作用于 HepG2-β-catenin 和 HepG2 细胞形成的瘤体后，瘤体质量显著减少。前期体外实验表明过表达的 β-catenin 会加速 HepG2 肝癌细胞的增殖^[17]，本实验中发现 HepG2-β-catenin 组小鼠瘤质量 (1.70±0.19) g 显著大于 HepG2 组 (1.60±0.16) g ($P < 0.01$)，同样的证明了过表达 β-catenin 会使 HepG2 细胞形成的瘤体质量增加，同时也观察到 HepG2-β-catenin+人参皂苷 Rh₂ 组小鼠瘤质量 (1.10±0.12) g 大于 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组 (1.00±0.13) g，进一步阐明过表达的 β-catenin 能削弱人参皂苷 Rh₂ 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用。

肿瘤的正常增殖主要由细胞的增殖失控引起

的，与之相伴随的是 DNA 的快速复制和细胞核的异型^[18]。用 HE 染色法观察肿瘤组织中细胞的形态，结果显示，HepG2-β-catenin 组和 HepG2 组肿瘤组织细胞核呈异型性，且占整个细胞比例大，在 HepG2-β-catenin 组细胞中更为明显。人参皂苷 Rh₂ 作用于 HepG2-β-catenin 和 HepG2 荷瘤小鼠后，瘤体细胞核固缩，形成大量破碎细胞，而 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组细胞核固缩及细胞破碎更明显。说明过表达的 β-catenin 可引起肿瘤的异常增殖，同时可削弱人参皂苷 Rh₂ 对 HepG2 细胞的作用。

为了进一步阐明人参皂苷 Rh₂ 对 HepG2 细胞形成的瘤体影响的作用机制，在体外实验中发现人参皂苷 Rh₂ 对 HepG2 细胞的抗癌作用是通过 GSK-3β-β-catenin 通路实现的。GSK-3β 的异常磷酸化及失活参与肝癌的形成。最近通过 80 例病例分析，研究发现肝癌组织中 GSK-3β 蛋白的表达水平显著低于正常肝组织及癌旁组织，而且 GSK-3β 低表达的临床病理特征预示着预后不良^[15]。GSK-3β

的表达与血管入侵、组织评分、肿瘤分级相关,同时还可能涉及肝癌的转移过程^[15,19]。GSK-3 β 具有致癌的潜质,但它也是一个极有利的抗癌治疗靶点。为了进一步检测上述信号通路在体内的作用,采用免疫组化法检测 GSK-3 β 的分布,在 HepG2- β -catenin 组和 HepG2 组小鼠肿瘤组织中,GSK-3 β 棕黄色颗粒主要存在于细胞胞质中,在经人参皂苷 Rh₂ 诱导后,GSK-3 β 棕黄色颗粒的量明显增加。同时,ELISA 的结果也表明人参皂苷 Rh₂ 作用于 HepG2- β -catenin 和 HepG2 荷瘤小鼠后肿瘤组织中 GSK-3 β 的活性显著增强。结果表明人参皂苷 Rh₂ 在肿瘤组织中也能激活 GSK-3 β 的活性。 β -catenin 在正常组织及癌组织中作为一个重要的分子,其稳定性依赖于由 Axin、APC 和 GSK-3 β 构成的降解复合物,主要由 GSK-3 β 去调节 β -catenin 在细胞内的表达水平^[14],用免疫组化法检测 β -catenin 的位置,在 HepG2- β -catenin 和 HepG2 细胞 β -catenin 棕黄色颗粒存于细胞质和细胞核中,但 HepG2- β -catenin 组中 β -catenin 棕黄色颗粒多于 HepG2 组中。在人参皂苷 Rh₂ 诱导后, β -catenin 棕黄色颗粒在细胞质和细胞核中的量减少,同时采用 PCR 和 Western blotting 检测了 HepG2 细胞形成的瘤体组织中 β -catenin 基因和蛋白的表达。结果表明,与 HepG2 荷瘤组织相比,HepG2+人参皂苷 Rh₂ 荷瘤组织细胞中 β -catenin 基因和蛋白表达水平明显下降。同时检测 HepG2- β -catenin 细胞,检验过表达的 β -catenin 能否削弱人参皂苷 Rh₂ 对 β -catenin 的降解作用。结果发现与 HepG2- β -catenin 荷瘤组相比,HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 荷瘤组织中 β -catenin 基因和蛋白水平有所下降,但下降幅度没有 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 荷瘤组明显。该结果表明过表达的 β -catenin 能削弱人参皂苷 Rh₂ 对 β -catenin 的降解作用,进一步证实人参皂苷 Rh₂ 降解 β -catenin 是通过激活 GSK-3 β 的活性。

在 Wnt 的刺激下,GSK-3 β 向细胞膜转移并与 Dishevelled and LRP-5 受体结合从而阻止了 GSK-3 β 对 β -catenin 的磷酸化,其结果是 β -catenin 逃脱了蛋白酶体的降解,从而在胞浆累积并向胞核移位。进入细胞核的 β -catenin 在染色质处于松弛状态条件下可以与 TCF 结合。 β -catenin 的 R10-C 区域暴露末端能与 HAT 蛋白 CBP 和 p300 结合,随之转录因子、转录复合物、RNA 聚合酶募集在 β -catenin 平台上,启动下游基因的激活。 β -catenin

的转移至核内的量减少将导致其与 TCF 结合力降低,不利于转录因子、转录复合物、RNA 聚合酶在 β -catenin 平台上募集,也不利于 DNA 启动区结合,导致包括 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 下游基因表达减少^[18]。采用 PCR 检测经模型小鼠瘤体组织中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 基因表达变化。结果显示,与 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组相比,HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组肿瘤组织中 Cyclin D1、Bcl-2 和 MMP-3 的表达减少而 Bax 增加。同时也检测了 HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 和 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 基因和蛋白。发现 HepG2- β -catenin+人参皂苷 Rh₂ 组中 Bax 基因和蛋白表达增加程度与 Bcl-2、Cyclin D1、MMP-3 基因和蛋白表达减少程度均弱于 HepG2+人参皂苷 Rh₂ 组 ($P < 0.01$)。该结果表明人参皂苷 Rh₂ 可通过激活 GSK-3 β 的活性降解 β -catenin,使进入细胞核内 β -catenin 减少,进而抑制周期、增殖及迁移相关蛋白的表达,促进凋亡相关蛋白的表达,最终抑制 HepG2 细胞的增殖,促进其凋亡;而过表达 β -catenin 能削弱人参皂苷 Rh₂ 对 HepG2 细胞的促凋亡作用。

人参皂苷 Rh₂ 抗肿瘤的作用显著,但其能否抑制肿瘤的转移尚未证实。 β -catenin 同时也是一个黏附分子,Miyazawa 等^[14]发现 β -catenin 在细胞核表达可促进肿瘤的浸润。MMP-3 是降解细胞外基质的重要基质金属蛋白水解酶,通过降解分布在细胞外基质和基底膜的 IV 型胶原,参与肿瘤的浸润和转移过程,因此 MMP-3 与肿瘤转移密切相关^[20-22]。本实验采用 Western blotting 和免疫组化检测了与转移相关 β -catenin 和 MMP-3 因子,结果显示,人参皂苷 Rh₂ 能够抑制 β -catenin 和 MMP-3 蛋白和基因的表达。本研究结果还提示人参皂苷 Rh₂ 能抑制肿瘤的转移。

综上所述,过表达的 β -catenin 可削弱人参皂苷 Rh₂ 对肝癌 HepG2 细胞的药理作用。人参皂苷 Rh₂ 对肝癌质量的抑制作用是通过激活 Gsk-3 β 降解 β -catenin 而实现的,且能抑制肿瘤的转移。

参考文献

- [1] Jung H K, Lee D S, Yoon S S, *et al.* Systemic metastasis of hepatocellular carcinoma responsive to multidisciplinary treatment including debulking surgery [J]. *Ann Surg Treat Res*, 2014, 86(2): 100-104.
- [2] Tanase A M, Dumitrascu T, Dima S, *et al.* Influence of

- hepatitis viruses on clinico-pathological profiles and long-term outcome in patients undergoing surgery for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatob Pancr Dis Intern*, 2014, 13(2): 162-172.
- [3] Li C, Zhao H, Zhao J, *et al.* Prognosis of patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism after surgery: a single-center experience from the People's Republic of China [J]. *Onco Targets Ther*, 2014(7): 957-964.
- [4] Page A J, Cosgrove D C, Philosophe B, *et al.* Hepatocellular carcinoma: diagnosis, management, and prognosis [J]. *Surg Oncol Clin*, 2014, 23(2): 289-311.
- [5] 冯子强, 左国伟, 石庆强, 等. 人参皂苷 Rh₂ 抑制肝癌 HepG2 细胞迁移的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 13(1): 61-65.
- [6] Christensen L P. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 55: 1-99.
- [7] 赵越, 苏适. 人参皂甙 Rh₂ 抗肿瘤作用的研究 [J]. 微生物学杂志, 2003, 23(3): 61-63.
- [8] Yan X J, Gong L H, Zheng F Y, *et al.* Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(4): 482-488.
- [9] 徐晓军, 石淑文, 汤永民, 等. 人参皂苷 Rh₂ 抗白血病多药耐药细胞 K562/VCR 作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1131-1135.
- [10] 游智梅, 陈地龙, 赵亮, 等. 下调 PGI/AMF 基因协同人参皂苷 Rh₂ 对白血病 KG1 α 细胞作用的体外研究 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 960-965.
- [11] Cheng C C, Yang S M, Huang C Y, *et al.* Molecular mechanisms of ginsenoside Rh₂-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 55(6): 531-408.
- [12] Wang Z, Zheng Q, Liu K, *et al.* Ginsenoside Rh₂ enhances antitumour activity and decreases genotoxic effect of cyclophosphamide [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006, 98(4): 411-415.
- [13] 刘晓岩, 李静, 王建伟, 等. 人参总皂苷 TSPG 对白血病细胞 KG1 α 增殖的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2599-2603.
- [14] Miyazawa K, Iwaya K, Kuorda M, *et al.* Nuclear accumulation of beta-catenin in intestinal type gastric carcinoma: Corelation with early tumor invasion [J]. *Virchows Arch*, 2000, 437(5): 508-513.
- [15] Maurer U, Preiss F, Brauns-Schubert P, *et al.* GSK-3 β at the crossroads of cell death and survival [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(7): 1369-1378.
- [16] Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, *et al.* Reciprocal targeting of Hath 1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 208-220.
- [17] 王启明, 贾连群, 周鸿鹰, 等. Wnt/ β -catenin 信号因子在 HepG2 以及 L02 细胞中的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(10): 926-928.
- [18] 石庆强, 左国伟, 冯子强, 等. 曲古抑菌素对 HepG2 细胞的影响及相关机制研究 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(7): 917-922.
- [19] 王剑飞, 侯瑛, 葛瑞良, 等. 糖原合酶激酶-3 β 在肝癌细胞迁移过程中的作用 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(1): 28-33.
- [20] 彭东涛, 苟欣, 何梓铭. 膀胱癌组织中 MMP9、MMP2 与 PCNA 及临床指标的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(4): 467-469.
- [21] Fanjul-Fernandez M, Folgueras A R, Cabrera S, *et al.* Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(1): 3-19.
- [22] Mendes O, Kim H T, Stoica G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(3): 237-246.