

人参皂苷 Rh₂ 抑制人非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究

孙小单¹, 王天鸣², 李 慧³, 赵沛妍¹, 刘 岩³, 程 颖^{4*}

1. 吉林省肿瘤医院 博士后科研工作站, 吉林 长春 130012
2. 长春中医药大学中医学院, 吉林 长春 130117
3. 吉林省肿瘤医院 肿瘤转化医学实验室, 吉林 长春 130012
4. 吉林省肿瘤医院 胸部肿瘤内科, 吉林 长春 130012

摘 要:目的 考察人参皂苷 Rh₂ 对人非小细胞肺癌 A549 及 H460 细胞增殖的影响, 并进一步探讨其作用机制。方法 人参皂苷 Rh₂ 处理 A549 及 H460 细胞, 采用 CCK-8 法及克隆形成实验检测药物对细胞增殖的作用; 观察药物对细胞形态的影响, 利用 Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 双染法检测细胞凋亡情况; 利用乳酸检测试剂盒检测药物对细胞糖酵解产物即乳酸生成的影响; 采用 Western blotting 法检测药物对线粒体凋亡蛋白 [B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)], 糖酵解调节通路信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) /c-myc 及糖酵解途径关键酶丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 表达的影响。上调 c-myc 表达后, 观察人参皂苷 Rh₂ 对 A549 及 H460 细胞乳酸水平的影响。结果 人参皂苷 Rh₂ 可明显抑制 A549 及 H460 细胞的增殖能力及克隆形成能力 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 呈剂量和时间相关性。人参皂苷 Rh₂ 明显改变 A549 及 H460 细胞形态并诱导细胞凋亡 ($P < 0.05$), 显著降低乳酸生成量 ($P < 0.05$ 、 0.01)。人参皂苷 Rh₂ 可显著下调 Bcl-2/Bax、PKM2、LDHA 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 上调 Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 并抑制 STAT3/c-myc 通路活性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。上调 c-myc 表达后, 人参皂苷 Rh₂ 对 A549 及 H460 细胞乳酸水平的抑制作用减弱 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 人参皂苷 Rh₂ 显著抑制 A549 及 H460 细胞的增殖, 其机制可能是通过调控线粒体凋亡蛋白、抑制 STAT3/c-myc 通路及糖酵解关键酶的表达干扰糖酵解, 最终导致细胞凋亡。

关键词: 人参皂苷 Rh₂; 非小细胞肺癌; 增殖; 凋亡; 糖酵解; 信号传导与转录激活因子 3/c-myc 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0441-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.014

Mechanism of ginsenoside Rh₂ on inhibiting proliferation of human non-small cell lung cancer cells

SUN Xiao-dan¹, WANG Tian-ming², LI Hui³, ZHAO Pei-yan¹, LIU Yan³, CHENG Ying⁴

1. Postdoctoral Research Workstation, Jilin Cancer Hospital, Changchun 130012, China
2. College of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China
3. Laboratory of Translational Cancer Research, Jilin Cancer Hospital, Changchun 130012, China
4. Department of Medical Thoracic Oncology, Jilin Cancer Hospital, Changchun 130012, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of ginsenoside Rh₂ on proliferation of human non-small cell lung cancer A549 and H460 cells. **Methods** A549 and H460 cells were treated with ginsenoside Rh₂, CCK-8 assay and colony formation experiment were used to detect the effect of ginsenoside Rh₂ on cell proliferation; Effect of ginsenoside Rh₂ on cell morphology was observed; Cell apoptosis were detected by Annexin V-FITC/PI dye method; Level of glycolytic products (lactic acid) was tested by lactic acid detection kit. Protein expression levels of mitochondrial apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase-3 and glycolysis regulation pathway signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)/c-myc and

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82103343); 吉林省中医药科技项目 (2021095); 吉林省卫生计生委科研项目 (2018J021); 吉林省科技厅项目 (202002063JC)

作者简介: 孙小单 (1987—), 女, 博士研究生, 研究方向为肺癌的中西医结合治疗。E-mail: 15640584861@163.com

*通信作者: 程 颖, 女, 主任医师, 研究方向为肺癌靶向及免疫治疗。E-mail: chengying@csco.org.cn

glycolysis key enzymes pyruvate kinase M2 (PKM2) and lactate dehydrogenase A (LDHA) were detected by Western blotting. Effect of ginsenoside Rh₂ on lactate level in A549 and H460 cells after up-regulating c-myc expression were observed. **Results** Ginsenoside Rh₂ significantly inhibited the proliferation and colony formation ability of A549 and H460 cells in a concentration and time-dependent way ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Ginsenoside Rh₂ altered cell morphology and significantly induced cell apoptosis ($P < 0.05$) and reduced the levels of lactic acid ($P < 0.05, 0.01$). Ginsenoside Rh₂ down-regulated Bcl-2/Bax, PKM2 and LDHA protein expressions, up-regulated Caspase-3 expression ($P < 0.05$) and inhibited STAT3/c-myc pathway activity ($P < 0.05, 0.01$). The inhibitory effect of ginsenoside Rh₂ on lactate levels in A549 and H460 cells was abolished after up-regulating c-myc expression. **Conclusion** Ginsenoside Rh₂ has a significant inhibitory effect on proliferation of A549 and H460 cells. The mechanism may be through regulating mitochondrial apoptotic proteins, inhibiting STAT3/c-myc pathway and reducing glycolysis key enzyme expression to interfere glycolysis, and then leading to cells apoptosis.

Key words: ginsenoside Rh₂; non-small lung cancer; proliferation; apoptosis; glycolysis; signal transducer and activator of transcription 3/c-myc pathway

肺癌是目前全球最常见的恶性肿瘤之一^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌中最常见的组织学类型, 约占 85%^[2]。中医是我国传统文化瑰宝, 将中医辨证论治思维与现代医学认识相结合的治疗理念及中西医药物结合治疗在肺癌诊治中备受瞩目。但中医药作用靶点模糊, 基础研究有限, 制约了其临床应用, 因此, 明确中药抗肿瘤的作用机制尤为重要。

人参皂苷 Rh₂ 为人参属植物的重要活性物质之一, 为四环三萜类皂苷单体, 具有丰富的药理活性, 包括提高机体免疫力、增强记忆与认知能力、抗抑郁、保护心肌等。一直以来, 人参皂苷 Rh₂ 单体作为提高机体免疫力的保健食品 (今幸胶囊) 应用, 但目前越来越多的研究发现, 在肿瘤治疗方面, 其亦可通过多种机制发挥抗肿瘤作用, 如抑制 NSCLC、乳腺癌、肝癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞增殖、侵袭, 诱导细胞凋亡、周期阻滞及改善化疗不良反应等^[3-4]。肿瘤作为一个复杂的整体, 其周围的微环境是肿瘤细胞增殖、侵袭转移及免疫逃逸不可或缺的重要因素, 如肿瘤迅速增长可造成缺血缺氧微环境^[5]、高速有氧糖酵解可导致酸性微环境^[6]等。与正常组织的有氧氧化获能迥然不同, 在适应上述微环境的过程中, 肿瘤细胞能量代谢发生较大变化, 即无论在常氧或低氧状态下, 都以糖酵解为主要能量代谢途径, 这种现象称为 Warburg 效应^[7]。因此, 抑制肿瘤细胞糖酵解、改善肿瘤酸性微环境可能成为潜在的肿瘤治疗方案。目前人参皂苷 Rh₂ 对 NSCLC 糖酵解水平的影响及机制尚未明晰, 因此, 本研究拟通过体外实验探索人参皂苷 Rh₂ 对人 NSCLC 细胞 A549 及 H460 的增殖能力、凋亡及糖酵解水平的影响及可能机制, 以期为人参皂苷 Rh₂

在临床中的应用提供一定理论基础。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌细胞 A549 (目录号 SCSP-503) 及 H460 (目录号 SCSP-584) 细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rh₂ (批号 C1622014, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; RPMI 1640 培养基 (批号 2111071)、胎牛血清 (批号 1966174C) 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 C0038)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 01192120528) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 乳酸测定试剂盒 (批号 20210320) 购自南京建成生物工程研究所; Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡双染试剂盒 (批号 9312842) 购自美国 BD 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 2020043001) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; c-myc 抗体 (批号 02)、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体 (批号 02)、磷酸化 STAT3 (phosphorated STAT3, p-STAT3) 抗体 (批号 03)、丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 抗体 (批号 4)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抗体 (批号 03)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体 (批号 02)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 5)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体 (批号 12) 购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 17A061) 购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.3 仪器

ECO 超净工作台(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CLARIOstar 酶标仪(德国 BMG LABTECH 公司); PowerPac HC 蛋白质垂直电泳仪、ChemiDocXRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), FACS Aria III 流式细胞仪(美国 BD 公司); CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 人参皂苷 Rh₂ 储存液的配制

将 20 mg 人参皂苷 Rh₂ 按照说明书要求完全溶解于 1 mL 二甲基亚砜中, 配制成质量浓度为 20 mg/mL 的储存液后分装。后续使用无血清培养基将储存液按照实验要求进行稀释后处理细胞。

2.2 细胞培养及分组

在 37 °C、5% CO₂ 条件下, 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 T25 培养瓶中常规培养 A549 及 H460 细胞株, 常规换液、传代, 待细胞培养至对数生长期进行实验。设置对照组及实验组, 对照组常规培养, 不予药物处理, 实验组给予不同质量浓度人参皂苷 Rh₂ 处理。细胞转染前 24 h 将细胞接种于 6 孔板, 细胞密度约为 80%, 根据 Lipofectamine 3000 试剂说明书进行转染 c-myc 空载质粒与表达质粒, 转染 48 h 后检测转染效率。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力

将细胞以 3000 个/孔接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后分别更换为含梯度质量浓度(0、5、10、20、40、80 μg/mL) 人参皂苷 Rh₂ 的培养基, 继续培养 24~72 h, 每组设置 5 个复孔。待培养结束时, 按照 CCK-8 试剂盒说明书要求, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 避光培养 2 h, 采用酶标仪测定各孔 450 nm 处的吸光度(*A*)值, 计算细胞存活率。使用 Graphpad Prism 8.0 软件计算药物半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀), 并根据 *A* 值绘制细胞增殖曲线。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 细胞克隆形成实验

将细胞以 500 个/孔均匀接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入不同质量浓度(10、20 μg/mL) 人参皂苷 Rh₂ 继续培养 14 d, 期间每 3 天更换含药培养基。培养结束时, 弃去培养基, 甲醇固定后结晶紫染色, 计数细胞克隆数, 绘制柱状图^[8]。

2.5 细胞形态观察

将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞

贴壁后更换含有人参皂苷 Rh₂ (40 μg/mL) 的培养基继续培养 48 h。待培养结束时, 利用倒置显微镜观察并拍摄各组细胞形态变化。

2.6 细胞凋亡检测

按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书进行实验。按“2.5”项下方法处理细胞, 待培养结束时, 使用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 离心后弃上清, 加入含 5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI 染色液的 500 μL 结合缓冲液轻柔重悬细胞, 室温避光染色 20 min, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.7 细胞乳酸生成量检测

按照乳酸检测试剂盒说明书进行实验操作, 收集“2.5”项下各组细胞培养上清, 按 1:4 稀释后, 加入试剂盒中的酶工作液及显色剂, 37 °C 水浴 10 min, 加入反应终止液, 记录各组反应液颜色变化; 取各组反应液 250 μL 加入 96 孔板中, 利用酶标仪测定 530 nm 处的 *A* 值, 计算细胞乳酸含量。

$$\text{乳酸含量} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准品}} - A_{\text{空白}}) \times \text{标准品浓度} \times \text{样品稀释倍数}$$

标准品浓度为 3 mmol/L, 样品稀释倍数为 5 倍

2.8 Western blotting 法检测糖酵解调控通路及关键酶的蛋白表达

按“2.5”项下方法处理细胞, 提取各组细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白质量浓度, 按照 40 μg 的上样质量配制蛋白样品。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中封闭后, 分别加入 Bcl-2、Bax、c-myc、Caspase-3、STAT3、p-STAT3、PKM2、LDHA、GAPDH 抗体(1:1000), 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 2 h, 使用 ECL 化学发光法显像, 利用 Image J 软件进行蛋白条带灰度分析, 并绘制柱状图。

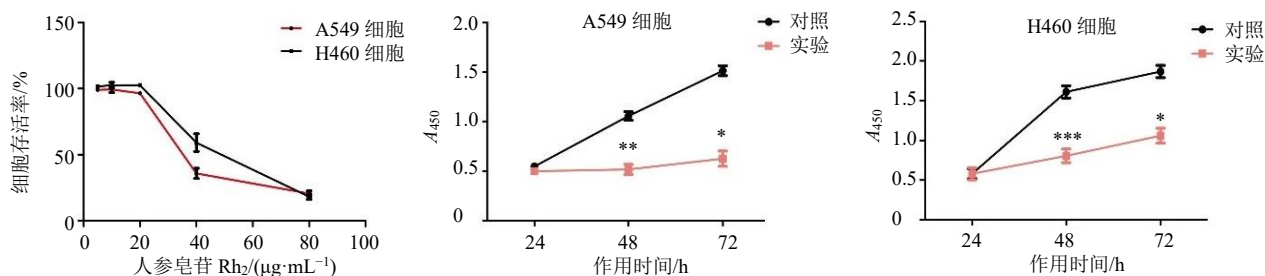
2.9 统计学方法

各实验独立重复 3 次以上, 使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析, 配对比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rh₂ 对细胞增殖能力的影响

如图 1 所示, A549 及 H460 细胞存活率随人参皂苷 Rh₂ 质量浓度的增加而逐渐下降, IC₅₀ 值分别为 (37.09 ± 3.88)、(46.89 ± 2.32) μg/mL。选择与 IC₅₀ 值相近的 40 μg/mL 进行后续实验观察。人参皂苷 Rh₂ (40 μg/mL) 处理 A549 及 H460 细胞 24、48、



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

图 1 人参皂苷 Rh₂ 对细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

72 h, 从 48 h 开始, 与对照组比较, 实验组细胞的增殖活力受到明显抑制 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。由于作用 72 h 细胞死亡较多, 因此, 选择药物作用 48 h 作为后续实验的药物最佳作用时间。

3.2 人参皂苷 Rh₂ 对细胞克隆形成能力的影响

如图 2 所示, 实验组分别给予人参皂苷 Rh₂ IC₅₀ 值的 1/4、1/2 (即 10、20 $\mu\text{g/mL}$) 处理 A549 及 H460 细胞, 药物作用 14 d 后, 与对照组相比, 随着

人参皂苷 Rh₂ 的质量浓度增加, A549 及 H460 细胞的克隆形成数明显下降 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。

3.3 人参皂苷 Rh₂ 对细胞形态的影响

如图 3 所示, 对照组 A549 及 H460 细胞形态清晰饱满, 数量较多且密集; 人参皂苷 Rh₂ 作用 48 h 后 A549 及 H460 细胞则出现细胞形态皱缩模糊、体积减小, 边缘变亮, 数量明显减少并分散, 呈凋亡形态。

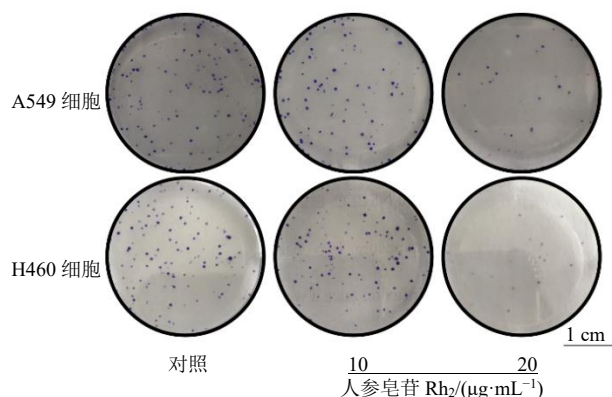


图 2 人参皂苷 Rh₂ 对细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell colony formation ability ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

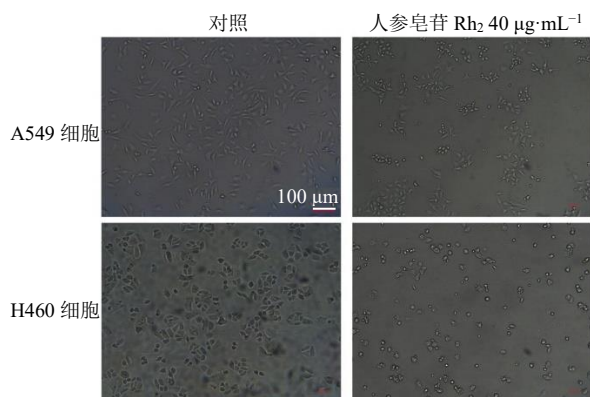
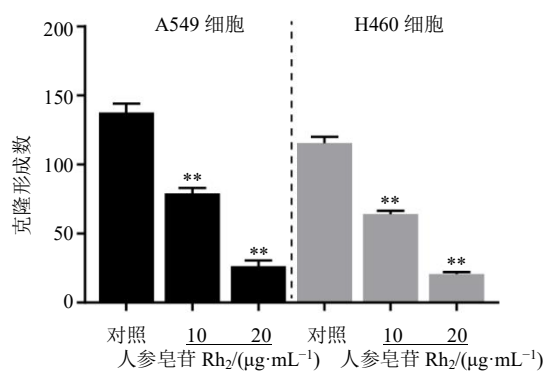


图 3 人参皂苷 Rh₂ 对细胞形态的影响

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell morphology

3.4 人参皂苷 Rh₂ 对细胞凋亡及线粒体凋亡蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 实验组 (人参皂苷 Rh₂) A549 及 H460 细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$)。如图 5 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rh₂ 可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 并上调促凋亡蛋白 Bax 表达, 从而下调 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 上调 Caspase 3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

3.5 人参皂苷 Rh₂ 对细胞乳酸水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 实验组 (人参皂苷 Rh₂) 反应液颜色明显变浅。与对照组比较, 实验组 A549 及 H460 细胞乳酸生成量均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

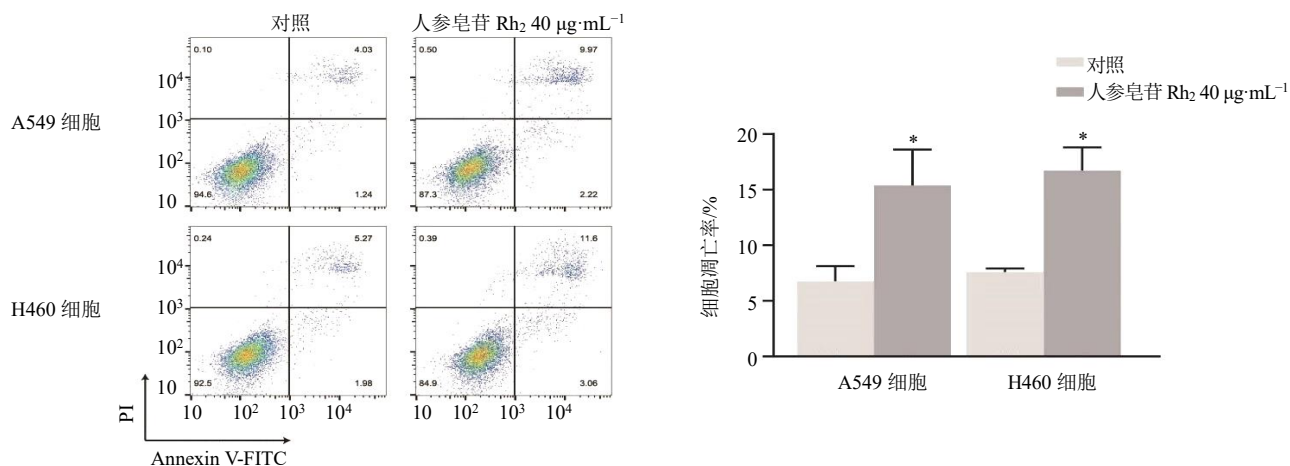


图 4 人参皂苷 Rh₂ 对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

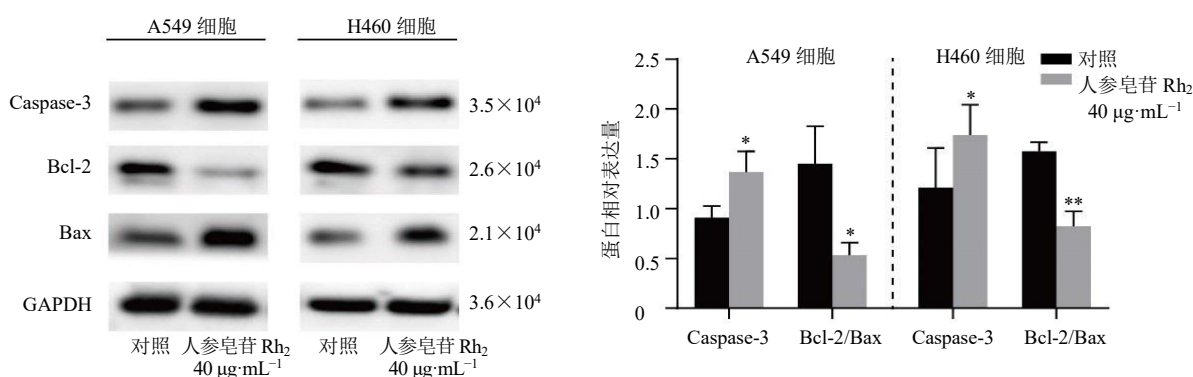


图 5 人参皂苷 Rh₂ 对线粒体凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of ginsenoside Rh₂ on protein expressions in mitochondrial apoptosis pathway ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

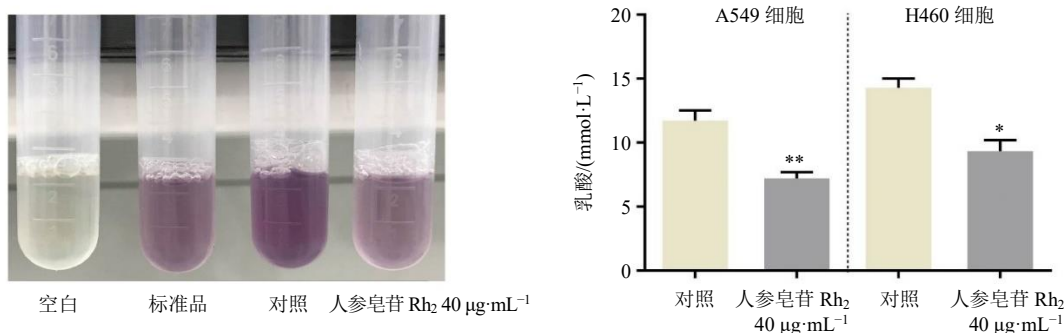


图 6 人参皂苷 Rh₂ 对细胞乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

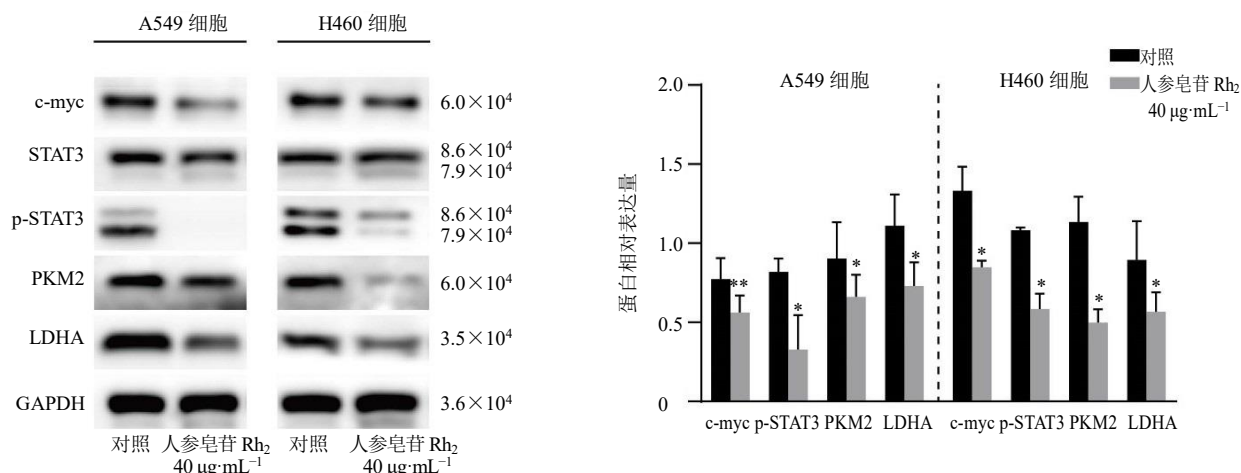
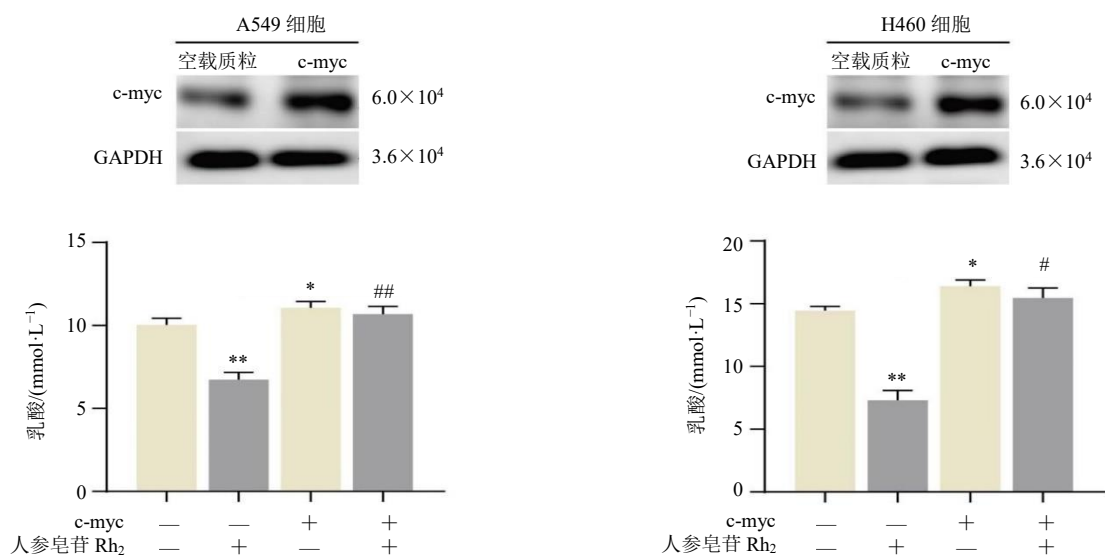
Fig. 6 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell lactate levels ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.6 人参皂苷 Rh₂ 对糖酵解调节通路及关键蛋白表达的影响

Western blotting 法检测人参皂苷 Rh₂ 对 STAT3/c-myc 通路蛋白及 PKM2 与 LDHA 等糖酵解途径关键酶表达的影响, 结果见图 7。与对照组相比, 实验组 (人参皂苷 Rh₂) A549 及 H460 细胞 c-myc、p-STAT3、PKM2、LDHA 蛋白表达水平均明

显下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

上调 c-myc 表达后人参皂苷 Rh₂ 对乳酸生成的影响见图 8, 与转染空载质粒比较, 转染 c-myc 表达质粒可明显上调 c-myc 蛋白表达水平。上调细胞中 c-myc 表达后, 乳酸生成量明显增加 ($P < 0.05$), 而人参皂苷 Rh₂ 对乳酸生成的抑制作用减弱 ($P < 0.05, 0.01$)。

图 7 人参皂苷 Rh₂ 对糖酵解调节通路及关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 7 Effect of ginsenoside Rh₂ on expression of key proteins in glycolysis pathway ($\bar{x} \pm s, n = 5$)与转染空载质粒组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 人参皂苷 Rh₂ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs transfection with empty plasmid group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs ginsenoside Rh₂ group图 8 上调 c-myc 表达后人参皂苷 Rh₂ 对乳酸生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 8 Effect of ginsenoside Rh₂ on cell lactic acid levels after upregulating c-myc expression ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

著名科学家奥托·瓦博格在 20 世纪 20 年代提出了著名的 Warburg 效应: 肿瘤细胞在快速生长的过程中, 即便在氧气充足的条件下, 仍然采取糖酵解方式进行能量代谢, 表现为葡萄糖消耗增快, 乳酸生成增多。乳酸的累积会形成酸性微环境, 利于肿瘤发生发展、免疫逃逸等。目前, 虽然越来越多的文献报道了人参皂苷 Rh₂ 的多种抗肿瘤作用与机制, 但对糖酵解的调节作用及机制尚未阐明, 因此, 本研究率先着眼于人参皂苷 Rh₂ 对人 NSCLC 细胞糖酵解水平的影响与潜在机制开展基础研究, 有利

于进一步明晰其抗肿瘤的作用靶点。

本研究首先验证了人参皂苷 Rh₂ 对 A549 及 H460 细胞的增殖及克隆形成能力的影响, 利用梯度质量浓度的药物处理细胞后, 细胞增殖能力随药物质量浓度的增加与作用时间的延长而下降, 2 种细胞的药物 IC₅₀ 值约为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与文献报道中人参皂苷 Rh₂ 对 A549 细胞的 IC₅₀ 值 (35.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 接近^[9]。此外, 细胞克隆形成能力的下降亦呈剂量相关性, 以上结果表明人参皂苷 Rh₂ 对细胞的增殖具有较强的抑制作用。结合药物处理后的细胞形态变化, 进一步通过流式细胞仪观察到人参皂苷 Rh₂ 能

够显著促进细胞凋亡, Western blotting 结果显示其可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 并上调促凋亡蛋白 Bax 及启动蛋白 Caspase 3 的表达。上述结果证明, 人参皂苷 Rh₂ 可有效抑制细胞增殖, 诱导凋亡, 并调节线粒体凋亡蛋白的表达, 与人参皂苷 Rh₂ 在胃癌^[10]、白血病^[11]、前列腺癌^[12]等其他多种肿瘤中的报道相一致。

乳酸是糖酵解的重要终产物, 测定培养液中的乳酸含量能够代表细胞的糖酵解水平。文献报道, 人参皂苷中的另一常见亚型—人参皂苷 Rg₃, 可抑制卵巢癌细胞培养液中的乳酸生成^[13], 本研究观察到人参皂苷 Rh₂ 可显著下调 A549 及 H460 细胞产生的乳酸量, 改善酸性微环境。酸性微环境可通过多种机制调控细胞的线粒体凋亡过程, 从而影响细胞增殖^[14]。如活化磷酸戊糖途径来减少活性氧水平, 降低氧化应激, 抑制凋亡^[15]; 亦可抑制聚腺苷二磷酸核糖聚合酶的裂解与 DNA 断裂, 减少凋亡^[16]。此外, 在酸性条件 (pH 6.5) 下培养淋巴瘤细胞, 可激活 T 细胞死亡偶联基因 8, 进而上调 Bcl-2 与 Bcl-XL 的表达来抵抗细胞凋亡^[17]。STAT3/c-myc 通路不仅在肿瘤发生发展方面起到重要的促进作用, 更是调控糖酵解途径的重要因素。STAT3 可作为转录因子促进糖酵解限速酶己糖激酶 2 的表达, 从而上调糖酵解水平^[18]。c-myc 可通过参与谷氨酸盐代谢, 催化谷氨酰胺分解产生乳酸, 促进糖酵解^[19]。在胃癌中, STAT3/c-myc 通路可与哺乳动物雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR) /PKM2 通路发生串话, 共同调控胃癌细胞的能量代谢^[20]。本研究发现人参皂苷 Rh₂ 处理细胞后, c-myc 及 p-STAT3 蛋白表达水平下降, 提示该通路活性降低。此外, PKM 是糖酵解过程中的关键酶之一, 可分为 M1、M2、L 和 R 型 4 种同工酶, 其中 PKM2 与丙酮酸的产生密切相关^[21]。LDHA 亦是糖酵解途径中的关键酶, 在最后一步发挥作用, 可催化丙酮酸生成乳酸^[22], 二者的表达水平在一定程度上可代表糖酵解途径活性。文献报道显示白头翁皂苷^[23]、雷公藤红素^[24]等多种中药可通过调控上述酶的表达或活力而影响肿瘤细胞的糖酵解水平。本研究发现, 人参皂苷 Rh₂ 可显著抑制 PKM2 及 LDHA 的蛋白表达水平。综上, 人参皂苷 Rh₂ 可能通过抑制糖酵解调节通路活性并下调糖酵解关键酶的表达从而影响乳酸的产生。

糖酵解途径是肿瘤细胞生存的必需条件, 因而

抑制糖酵解可起到阻断肿瘤能量来源的重要作用, 结合本研究的发现, 提示人参皂苷 Rh₂ 可作为肿瘤能量阻断剂发挥抗肿瘤的作用。但本研究仍存在以下局限性: ①本研究仅停留于体外实验, 应积极开展体内实验高度模拟肿瘤的酸性微环境, 明确人参皂苷 Rh₂ 对酸性微环境的作用靶点; ②本研究的机制研究不够深入, 应进一步设计功能挽救实验, 通过调控 STAT3/c-myc 通路活性或糖酵解关键酶的表达等, 再次观察人参皂苷 Rh₂ 对乳酸生成的抑制作用有无逆转; ③应补充观察人参皂苷 Rh₂ 对 Warburg 效应的另一主要特征—葡萄糖代谢水平的影响, 以全面阐明人参皂苷 Rh₂ 对人 NSCLC 细胞能量代谢的调控作用。

综上, 本研究利用体外实验观察到人参皂苷 Rh₂ 对 A549 及 H460 细胞可发挥抑制增殖、诱导凋亡、抑制糖酵解、降低乳酸水平的作用, 其机制可能与调控线粒体凋亡蛋白、下调糖酵解调节通路活性及关键酶的表达有关。人参皂苷 Rh₂ 可作为肿瘤能量阻断剂应用于 NSCLC 的辅助治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [3] Li X, Chu S, Lin M, et al. Anticancer property of ginsenoside Rh₂ from ginseng [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 203: 112627.
- [4] 许洪亮, 苗红, 李军, 等. 人参皂苷 Rh₂ 逆转 HepG2 细胞对 5-氟尿嘧啶耐药性作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(9): 1876-1881.
- [5] Wang B, Zhao Q, Zhang Y, et al. Targeting hypoxia in the tumor microenvironment: A potential strategy to improve cancer immunotherapy [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 24.
- [6] Boedtker E, Pedersen S F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 103-126.
- [7] Urbano A M. Otto Warburg: The journey towards the seminal discovery of tumor cell bioenergetic reprogramming [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(1): 165965.
- [8] Tan B Q, Huang Y Y, Lan L H, et al. Bruceine D induces

- apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulating JNK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109089.
- [9] 衣同辉, 王宏兰, 王洁, 等. 人参皂苷 20(S)-Rh₂ 联合 BMAP28 肽对肺癌细胞 A549 凋亡的影响及机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(22): 2719-2724.
- [10] 胡双双, 闫克敏, 王娇娇, 等. 人参皂苷 Rh₂ 对胃癌细胞 SGC7901/ADR 耐药敏感性的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4113-4117.
- [11] 刘泽洪, 陈益, 李静, 等. 人参皂苷 Rh₂(S) 抑制 HDAC6 促白血病细胞凋亡作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5876-5881.
- [12] Ben-Eltriki M, Deb S, Guns E S T. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ synergistically enhances anticancer effects of ginsenoside Rh₂ in human prostate cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 209: 105828.
- [13] Lu J J, Chen H, He F, *et al.* Ginsenoside 20(S)-Rg₃ upregulates HIF-1 α -targeting miR-519a-5p to inhibit the Warburg effect in ovarian cancer cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(8): 1455-1463.
- [14] Ji K, Mayernik L, Moin K, *et al.* Acidosis and proteolysis in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(1/2): 103-112.
- [15] Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding [J]. *J Physiol*, 2021, 599(6): 1745-1757.
- [16] Park H J, Lyons J C, Ohtsubo T, *et al.* Cell cycle progression and apoptosis after irradiation in an acidic environment [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7(8): 729-738.
- [17] Ryder C, McColl K, Zhong F, *et al.* Acidosis promotes bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27863-27875.
- [18] Zhou Y, Chen S, Yang F, *et al.* Rabeprazole suppresses cell proliferation in gastric epithelial cells by targeting STAT3-mediated glycolysis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188: 114525.
- [19] Huang W L, Abudurehman T, Xia J, *et al.* CDK9 inhibitor induces the apoptosis of B-cell acute lymphocytic leukemia by inhibiting c-myc-mediated glycolytic metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 641271.
- [20] Gao S M, Chen M, Wei W, *et al.* Crosstalk of mTOR/PKM2 and STAT3/c-Myc signaling pathways regulate the energy metabolism and acidic microenvironment of gastric cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(2): 1193-1202.
- [21] Zhu S, Guo Y, Zhang X, *et al.* Pyruvate kinase M2 (PKM2) in cancer and cancer therapeutics [J]. *Cancer Lett*, 2021, 503: 240-248.
- [22] Xu K, Yin N, Peng M, *et al.* Glycolysis fuels phosphoinositide 3-kinase signaling to bolster T cell immunity [J]. *Science*, 2021, 371(6527): 405-410.
- [23] 陈兰英, 周滕静, 崔亚茹, 等. 白头翁皂苷干预糖酵解途径抑制 SW480 人结直肠癌细胞增殖作用研究 [J]. 中药材, 2019, 42(3): 652-656.
- [24] 王淑静, 訾庆雪, 付玉, 等. 雷公藤红素对人肺癌 A549 细胞增殖活性及能量代谢的影响 [J]. 药学研究, 2020, 39(5): 266-268.

[责任编辑 李亚楠]