

人参皂苷 Rg₃ 通过 PI3K 途径抑制胰腺癌细胞上皮间质转化及血管生成拟态

赵婷婷¹, 王兆洪², 林胜璋^{1*}

1. 浙大城市学院医学院, 浙江 杭州 310015

2. 温州医科大学附属第二医院 普外科, 浙江 温州 325027

摘要: **目的** 探究人参皂苷 Rg₃ 通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 途径抑制胰腺癌细胞上皮间质转化及血管生成拟态的作用机制。**方法** 体外培养人胰腺癌 SW1990 细胞, 使用 5、10、20、40、80 μmol/L 人参皂苷 Rg₃ 处理细胞 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力并计算半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀), 后续实验使用 IC₅₀ 处理细胞; 采用流式细胞术检测细胞凋亡; 采用 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力; 采用三维培养观察细胞血管的生成; 采用 qRT-PCR 检测 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-cadherin 及 VE-cadherin mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin、VE-cadherin、PI3K 及 p-PI3K 蛋白表达。给予 PI3K 激活剂 740 Y-P 后, 考察各组细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、血管生成拟态及 E-cadherin、N-cadherin、VE-cadherin、PI3K、p-PI3K 表达情况。**结果** 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组细胞增殖、迁移和侵袭能力显著降低 ($P < 0.001$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$), N-cadherin、VE-cadherin 及 p-PI3K 的表达显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 管腔样网状结构的数目显著减少 ($P < 0.01$), E-cadherin 的表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001)。给予 PI3K 激活剂后, 部分逆转了人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞增殖、迁移和侵袭、上皮间质转化和血管生成拟态的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 人参皂苷 Rg₃ 通过抑制 PI3K 途径的活化, 进而抑制胰腺癌细胞上皮间质转化及血管生成拟态。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 胰腺癌; 上皮间质转化; 血管生成拟态; PI3K 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)18-6261-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.015

Ginsenoside Rg₃ inhibits epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry of pancreatic cancer cells through PI3K signaling

ZHAO Tingting¹, WANG Zhaohong², LIN Shengzhang¹

1. School of Medicine, Hangzhou City University, Hangzhou 310015, China

2. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of ginsenoside Rg₃ on inhibiting epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry of pancreatic cancer cells through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling. **Methods** Human pancreatic cancer SW1990 cells were cultured *in vitro* and treated with 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L ginsenoside Rg₃ for 24 h. CCK-8 was used to detect cell viability and half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated, and then the cells were treated with IC₅₀ in subsequent experiments; The apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell experiment was used to detect migration and invasion of cells. Three-dimensional culture was used to observe the formation of cell blood vessels. The mRNA expressions of E-cadherin, N-cadherin and VE-cadherin were detected by qRT-qPCR. The protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, VE-cadherin, PI3K and p-PI3K were detected by Western blotting. After administering PI3K activator 740 Y-P, proliferation, apoptosis, migration, invasion, vascular mimicry and expressions of E-cadherin, N-cadherin, VE cadherin, PI3K, p-PI3K of cells in each group were examined. **Results** Compared with control group, the proliferation, migration and invasion of SW1990 cells in ginsenoside Rg₃ group were significantly decreased ($P < 0.001$), apoptosis of cells was significantly increased ($P < 0.001$), the expressions of N-cadherin, VE-cadherin and p-PI3K were significantly down-regulated ($P < 0.01$, 0.001), the number of lumen-like reticular structures was significantly decreased

收稿日期: 2024-05-10

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ24H280004)

作者简介: 赵婷婷, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药理学。E-mail: zhaott@hzcu.edu.cn

*通信作者: 林胜璋, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药单体抗肿瘤分子机制。E-mail: linsz@hzcu.edu.cn

($P < 0.01$), and the expression of E-cadherin was significantly up-regulated ($P < 0.01, 0.001$). After administration of PI3K activator, the inhibitory effects of ginsenoside Rg₃ on proliferation, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry of SW1990 cells were partially reversed ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Ginsenoside Rg₃ inhibits epithelial-mesenchymal transition and vasculogenic mimicry of pancreatic cancer cells by inhibiting the activation of PI3K signaling pathway.

Key words: ginsenoside Rg₃; pancreatic cancer; epithelial-mesenchymal transition; vasculogenic mimicry; PI3K pathway

胰腺癌在所有癌症总病例中的占比不到 3%, 但其致死率较高, 约占癌症总死亡人数的 7%^[1], 且发病率逐年上升。由于胰腺癌的早期诊断较为困难, 大多数的胰腺癌患者在确诊时已经发生了转移。尽管在胰腺癌的检测和治疗方面取得了进步, 我国胰腺癌患者的 5 年生存率仅为 7.2%, 为所有癌症中最低^[2]。因此, 迫切需要寻找能够有效抑制胰腺癌转移的药物。临床研究表明, 上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在胰腺癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌等上皮细胞性肿瘤转移的启动至完成各步骤的过程中起到关键作用, 是肿瘤转移发生的标志物之一^[3], 同时, 新生血管生成在肿瘤的生长和转移过程中发挥着重要的作用^[4]。人参皂苷是传统药用植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的主要生物活性成分, 也是其发挥药理作用的主要成分。已有研究表明, 人参皂苷 Rg₃ 可有效抑制乳腺癌细胞^[5]、胰腺癌细胞^[6]的增殖。人参皂苷通过调节标志性分子 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达, 影响胰腺癌细胞的增殖及 EMT^[7], 提示人参皂苷 Rg₃ 可能通过抑制胰腺癌细胞 EMT 及血管拟态的形成, 从而抑制胰腺癌侵袭及转移。胰腺癌的发生发展过程涉及多种信号通路, 而磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 便是参与其发生的信号通路之一^[8], PI3K 具有丝氨酸/苏氨酸 (serine/threonine, Ser/Thr) 激酶以及磷脂酰肌醇激酶的活性, PI3K 的异常激活可引起肿瘤细胞的增殖、转移及肿瘤血管形成。已有研究表明, 靶向 PI3K 抑制剂可以有效诱导胰腺神经内分泌肿瘤凋亡, 阻碍其新生血管生长, 从而阻止肿瘤的发展和转移^[9]。本研究旨在研究人参皂苷 Rg₃ 是否通过抑制 PI3K 途径的活化, 从而抑制胰腺癌细胞 EMT 及血管生成拟态。

1 材料

1.1 细胞

人胰腺癌 SW1990 细胞 (货号 CL0302) 购自湖南丰晖生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rg₃ (质量分数为 98%, 批号

SML0184)、胎牛血清 (批号 F0193)、D-Hanks (批号 S-004-B) 购自美国 Sigma 公司; PI3K 激活剂 740 Y-P (批号 TQ0003) 购自 TargetMol 公司; 高糖 DMEM 培养基 (批号 C0891)、MTT 试剂盒 (批号 C0009S)、CCK-8 试剂 (批号 C0037)、0.25% Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1062L)、4% 多聚甲醛 (批号 P0099)、结晶紫染色液 (批号 C0121)、Matrigel 基质胶 (批号 C0372)、PBS 溶液 (批号 C0221A)、通透液 (批号 P0095)、DAPI 染色液 (批号 C1005) 购自碧云天生物技术公司; 胰蛋白酶 (批号 SH30042.01) 购自广州赛国生物科技有限公司; TRIzol 试剂、PrimeScript^{RT} 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; E-cadherin 抗体 (批号 GTX100443)、VE-cadherin 抗体 (批号 GTX132982) 购自美国 GeneTex 公司; N-cadherin 抗体 (批号 ab18203)、PI3K 抗体 (ab302958)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 ab181602)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab205718) 购自英国 Abcam 公司; p-PI3K 抗体 (批号 orb502214) 购自英国 Biorbyt 公司。

1.3 仪器

680 型酶标仪、PowerPac HC 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); ACEA NovoCyteTM 流式细胞仪 (美国 Aceabio 公司); BX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); CX5 型高通量细胞分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ABI 7900HT 型快速 PCR 实时系统 (美国 Applied Biosystems 公司); Microfuge 20/20R 型离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

SW1990 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 的培养箱中培养。选取第 3 代对数生长期状态较好的细胞进行后续实验^[10]。

2.2 CCK-8 检测细胞增殖能力

SW1990 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 分别加入 5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃

处理 24 h, 另设置对照组加入不含药物的培养基, 以及不接种细胞不含药物的空白孔。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 采用酶标仪测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。采用 GraphPad Prism 8.01 软件计算人参皂苷 Rg_3 对 SW1990 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50})。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

SW1990 细胞用 33 μ mol/L 人参皂苷 Rg_3 分别处理 24、48、72 h, 另设置对照组加入不含药物的培养基, 采用 MTT 试剂盒测定细胞活力。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况

SW1990 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组, 给药处理 24 h。收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 加入结合缓冲液重悬细胞。根据 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒的操作说明, 加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI), 室温避光孵育 15~20 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.4 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力

SW1990 细胞用无血清 DMEM 培养基以 2×10^5 个/孔接种于 Transwell 小室中, Transwell 小室下室中加入含 20% 血清的 DMEM 完全培养基。设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组, Transwell 小室加入药物处理 24 h。侵袭实验所用的 Transwell 小室提前加入 60 μ L Matrigel 基质胶进行铺胶。给药结束后, Transwell 小室用 4% 多聚甲醛进行固定以及结晶紫染色, PBS 润洗, 棉签轻轻擦去小室底部上层细胞, 室温风干, 光学显微镜下拍摄小室底部下层的细胞图片, Image J 软件计数迁移与侵袭的细胞数量, 分别计算细胞迁移率和侵袭率。

$$\text{细胞迁移率} = \text{给药组迁移细胞数} / \text{对照组迁移细胞数}$$

$$\text{细胞侵袭率} = \text{给药组侵袭细胞数} / \text{对照组侵袭细胞数}$$

2.5 三维培养观察细胞血管生成拟态情况

将 Matrigel 基质胶加入 96 孔板, 于培养箱中静置孵育 30 min, 使 Matrigel 基质胶凝固。SW1990 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组, 给药处理 24 h。弃去培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定液, 室温孵育 30 min; 弃去固定液, 加入通透液室温孵育 15 min; 弃去通透液, 加入 DAPI 染色液, 室温染色 10 min; 弃去染色液, 使用 D-Hanks

洗涤 1 次, 将 96 孔板置于高通量细胞分析仪中进行分析^[10]。

2.6 qRT-PCR 检测 *E-cadherin*、*N-cadherin* 及 *VE-cadherin* mRNA 表达

SW1990 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组, 给药处理 24 h。收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: *E-cadherin* 上游引物 5'-CGTAGCAGTGACGAATGTGG-3', 下游引物 5'-CTGGGCAGTGTAGGATGTGA-3'; *N-cadherin* 上游引物 5'-CAACTCCTCCAGTAGCGGTG-3', 下游引物 5'-TGTCCAAAAGCCAAGTCCGT-3'; *VE-cadherin* 上游引物 5'-AAGCGTGAGTCGCAA-3', 下游引物 5'-TCTCCAGGTTTTCGC-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-ACAACCTTGTGTATCGTGGAAGG-3', 下游引物 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。

2.7 Western blotting 检测 *E-cadherin*、*N-cadherin* 及 *VE-cadherin* 蛋白表达

SW1990 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组 (加入不含药物的培养基) 和人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组, 给药处理 24 h。收集细胞, 加入裂解液提取细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜; 加入二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。采用化学发光试剂盒检测蛋白条带, 使用 Image J 进行灰度分析。

2.8 PI3K 激活剂 740 Y-P 对人参皂苷 Rg_3 抑制 SW1990 细胞 EMT 及血管生成拟态作用的影响

设置对照组、人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) 组、人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) + DMSO 组、人参皂苷 Rg_3 (33 μ mol/L) + 740 Y-P (25 μ mol/L) 组, 细胞给予药物处理 24 h 后, 检测各组细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、血管生成拟态及 *E-cadherin*、*N-cadherin*、*VE-cadherin*、PI3K、p-PI3K 表达情况。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.01 软件进行统计分析和作图, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用 One-way ANOVA, 事后检验采用 Tukey's multiple comparisons test; CCK-8 实验采用 Two-way ANOVA, 事后检验采用 Tukey's multiple comparisons test。

3 结果

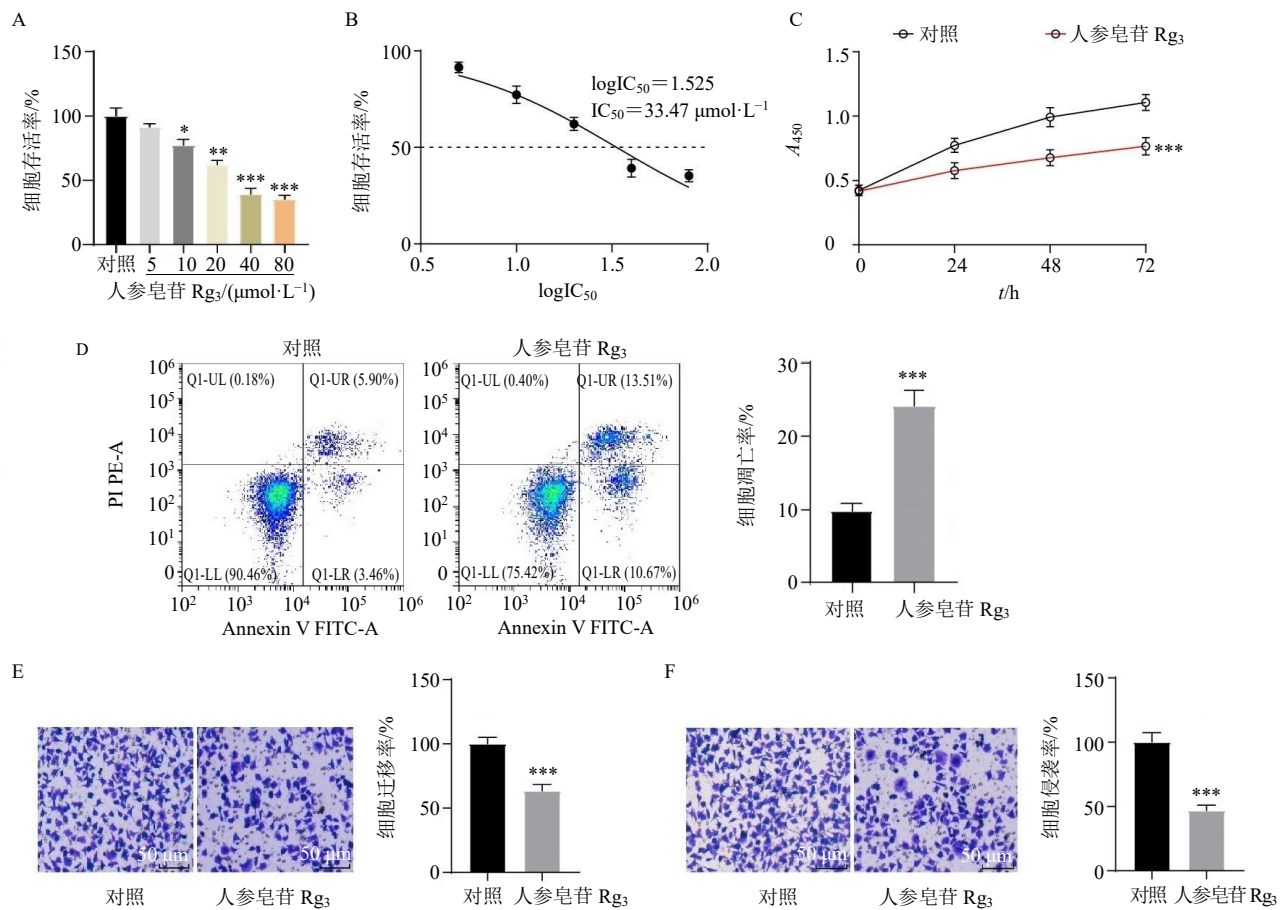
3.1 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

如图 1-A 所示, 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃ 处理 SW1990 细胞 24 h, 细胞存活率显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 $P<0.001$), 且呈剂量相关性。采用 GraphPad Prism 8.01 软件计算人参皂苷 Rg₃ 的 IC_{50} 值为 $33.47 \mu\text{mol/L}$ (图 1-B)。如图 1-C 所示, 33 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃ 处理 SW1990 细胞 24、48、72 h, 细胞活力显著降低 ($P<0.001$)。因此, 后续实验使用 33 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg₃ 处理 SW1990 细胞 24 h, 进一步探究人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞

恶性生物学行为的抑制作用。如图 1-D~F 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组 SW1990 细胞的凋亡率明显升高 ($P<0.001$), 迁移率和侵袭率明显降低 ($P<0.001$)。表明人参皂苷 Rg₃ 能够抑制 SW1990 细胞增殖、迁移和侵袭。

3.2 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞 EMT 的影响

研究表明, E-cadherin 和 N-cadherin 是 EMT 进程中重要的标志性分子^[7]。如图 2 所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组 SW1990 细胞中 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), N-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)。表明人参皂苷 Rg₃ 能够抑



A-不同浓度的人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞存活率的影响; B-人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞的 IC_{50} 值; C-人参皂苷 Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) 处理 SW1990 细胞 24、48、72 h, 对细胞活力的影响; D-人参皂苷 Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) 对 SW1990 细胞凋亡的影响; E-人参皂苷 Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) 对 SW1990 细胞迁移的影响 ($\times 200$); F-人参皂苷 Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) 对 SW1990 细胞侵袭的影响 ($\times 200$); 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下图同。

A-effect of different concentrations of ginsenoside Rg₃ on survival rate of SW1990 cells; B- IC_{50} value of ginsenoside Rg₃ on SW1990 cells; C-effect of ginsenoside Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) on cell viability in SW1990 cells treated for 24, 48, 72 h; D-effect of ginsenoside Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) on apoptosis of SW1990 cells; E-effect of ginsenoside Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) on migration of SW1990 cells ($\times 200$); F-effect of ginsenoside Rg₃ ($33 \mu\text{mol/L}$) on invasion of SW1990 cells ($\times 200$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group, same as below figures.

图 1 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of ginsenoside Rg₃ on proliferation, migration and invasion of SW1990 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

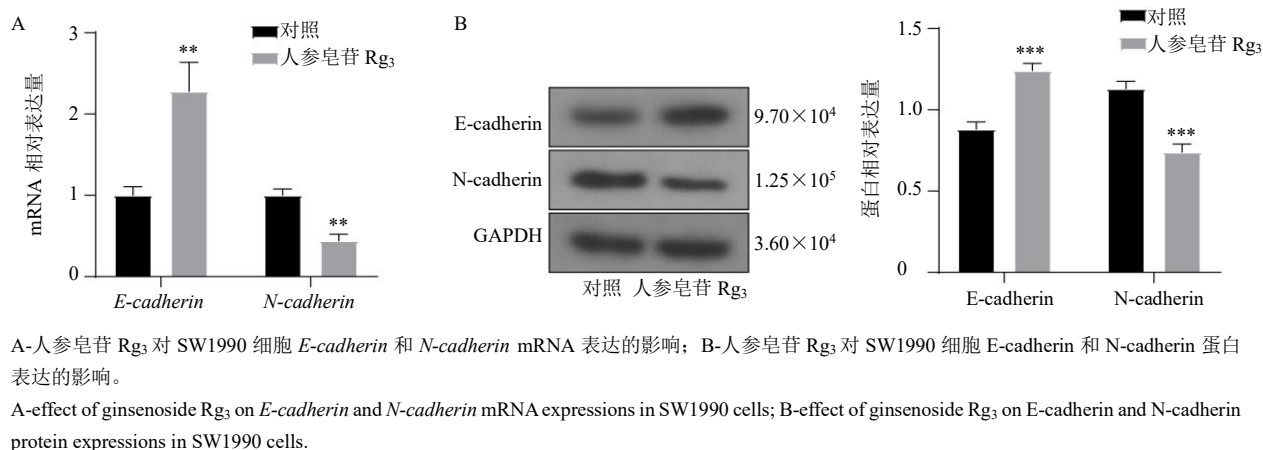


图 2 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞 EMT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of ginsenoside Rg₃ on EMT of SW1990 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制 SW1990 细胞 EMT。

3.3 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞血管生成拟态的影响

研究表明, VE-cadherin 是血管生成拟态进程中重要的标志性分子^[1]。为研究人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞血管生成拟态的影响, 首先通过三维培养的方法观察细胞血管生成拟态的情况, 结果显示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组 SW1990 细胞管腔样网状结构的数目显著减少 ($P < 0.01$, 图 3-A)。然后采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 *VE-cadherin* 的 mRNA 和蛋白表达情况, 如图 3-B、C

所示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组 SW1990 细胞中 *VE-cadherin* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。表明人参皂苷 Rg₃ 能够抑制 SW1990 细胞血管生成拟态。

3.4 人参皂苷 Rg₃ 通过抑制 PI3K 途径抑制 SW1990 细胞 EMT 及血管生成拟态

研究表明, PI3K 途径参与了胰腺癌的发生^[8]。为研究人参皂苷 Rg₃ 是否通过 PI3K 途径抑制 SW1990 细胞 EMT 及血管生成拟态, 采用 Western blotting 检测 PI3K 和 p-PI3K 蛋白表达 (图 4-A), 结果显示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rg₃ 组 p-PI3K/

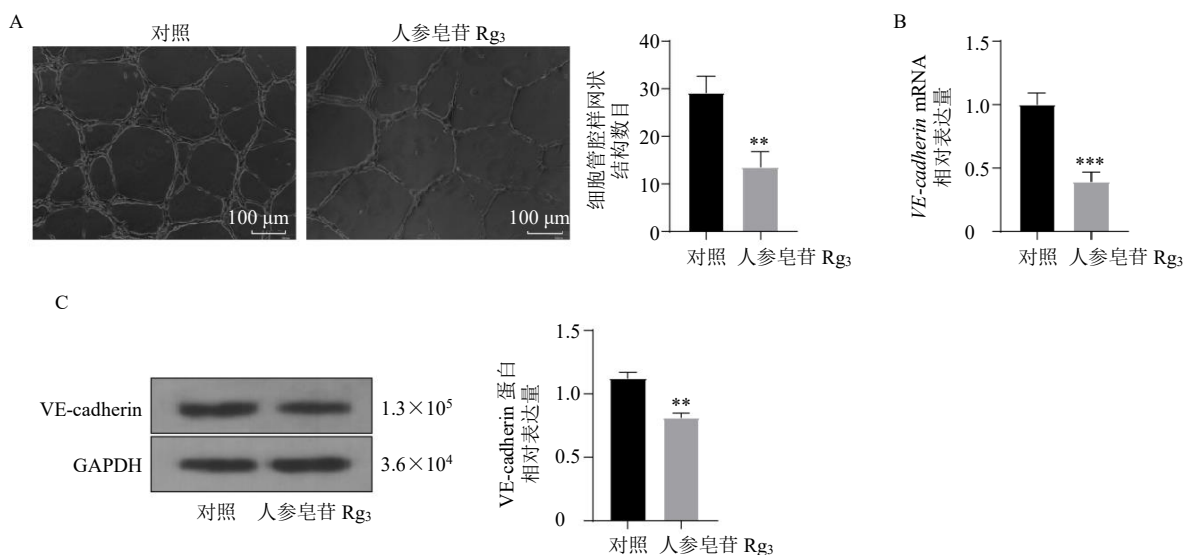
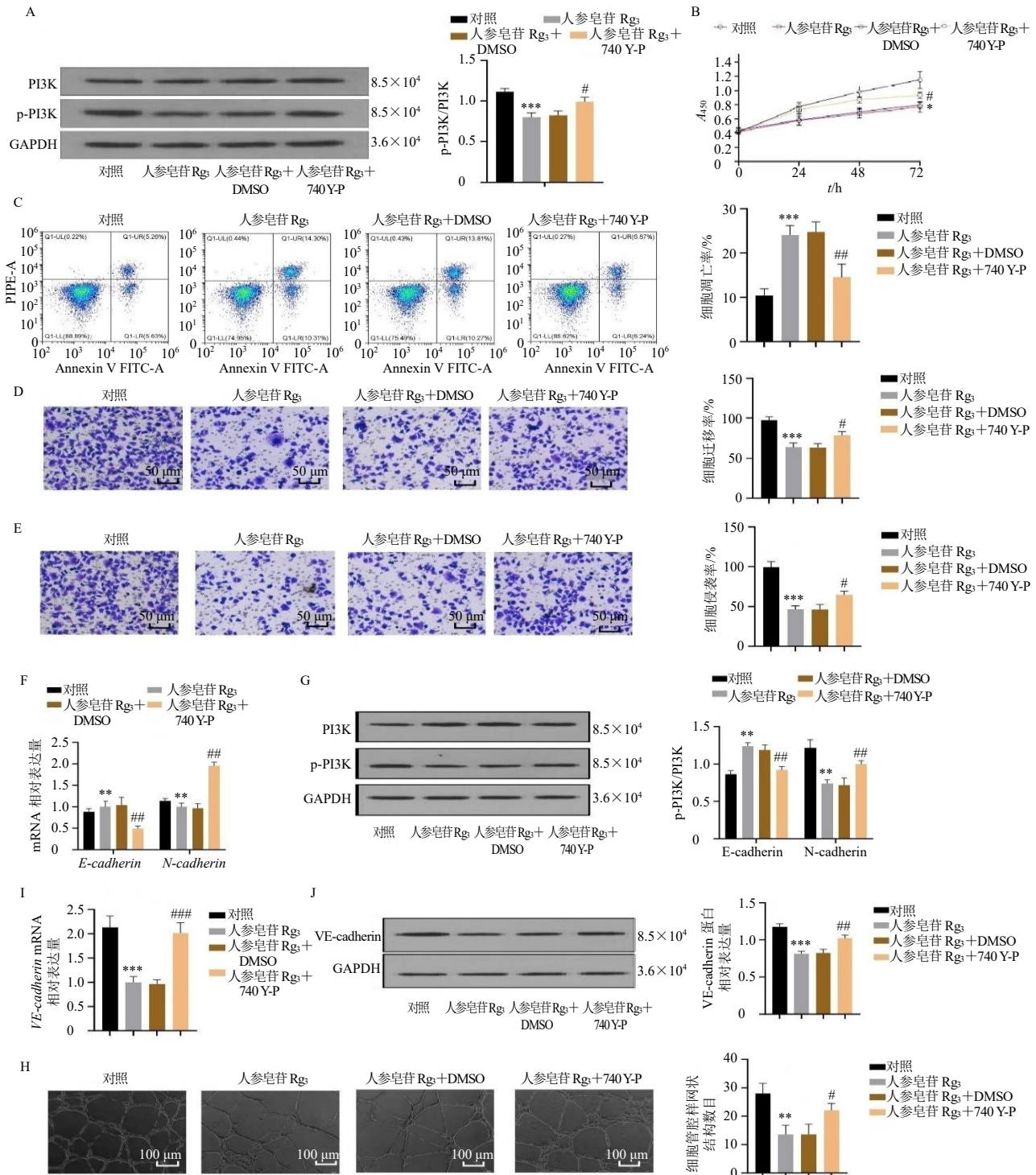


图 3 人参皂苷 Rg₃ 对 SW1990 细胞血管生成拟态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of ginsenoside Rg₃ on vasculogenic mimicry of SW1990 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-各组 PI3K 和 p-PI3K 蛋白表达; B-各组细胞活力; C-各组细胞凋亡情况; D-各组细胞迁移情况; E-各组细胞侵袭情况; F、G-各组 *E-cadherin* 和 *N-cadherin* mRNA 和蛋白表达; I、J-各组 *VE-cadherin* mRNA 和蛋白表达; H-各组细胞中管腔样网状结构数目; 与人参皂苷 Rg_3 + DMSO 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-PI3K 和 p-PI3K protein expressions in each group; B-cell viability in each group; C-apoptosis of cells in each group; D-migration of cells in each group; E-invasion of cells in each group; F, G-*E-cadherin* and *N-cadherin* mRNA and protein expressions in each group; I, J-*VE-cadherin* mRNA and protein expressions in each group; H-number of lumen-like reticular structures of cells in each group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs ginsenoside Rg_3 + DMSO group.

图 4 人参皂苷 Rg_3 通过抑制 PI3K 途径抑制 SW1990 细胞 EMT 及血管生成拟态 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Ginsenoside Rg_3 inhibits EMT and vasculogenic mimicry of SW1990 cells by suppressing PI3K signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PI3K 表达显著降低 ($P < 0.001$), 给予 PI3K 途径激活剂 740 Y-P 后 p-PI3K/PI3K 表达显著上调 ($P < 0.05$)。如图 4-B~H 所示, 与人参皂苷 Rg_3 +DMSO 组比较, 给予 PI3K 途径激活剂 740 Y-P 后, 细胞活力、迁移率和侵袭率显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), *E-cadherin* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), *N-cadherin* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *VE-cadherin* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 细胞中管腔样网状结构的数目显著增加 ($P < 0.05$)。表明人参皂苷 Rg_3 能够通过抑制 PI3K 途径抑制 SW1990 细胞 EMT 及血管生成拟态。

4 讨论

胰腺癌是一种易发生侵袭和转移的高度恶性肿瘤之一, 在疾病早期难以发现与诊断, 导致患者预后极差, 5 年生存率不足 10%^[2,12]。吉西他滨 (gemcitabine) 及奥沙利铂 (oxaliplatin) 等化疗药物已经应用于临床治疗胰腺癌, 但其疗效有限, 未能显著改善患者的生存率及生活质量^[13], 寻找新的有效治疗药物已成为当前胰腺癌防治研究的重要方向。人参皂苷是人参的主要药理活性成分, 有广泛的生物活性, 如提高免疫力^[14]、护肝^[15]、抗炎^[16]、抗肿瘤^[17]等。人参皂苷 Rg_3 是人参中重要的皂苷成分之一, 已有研究表明, 人参皂苷 Rg_3 可诱导乳腺癌细胞的凋亡^[5], 也能够抑制胰腺癌^[6]、直肠癌^[18]、胃癌^[19]、肺癌^[20]、前列腺癌^[21]及卵巢癌^[22]等多种癌细胞的增殖、迁移和侵袭。基于此, 本研究探讨了人参皂苷 Rg_3 对胰腺癌细胞生长及侵袭的抑制作用及作用机制。本研究发现, 人参皂苷 Rg_3 能够有效地抑制 SW1990 细胞增殖, 细胞增殖是肿瘤生长的基础, 表明人参皂苷 Rg_3 具有抗肿瘤活性; 流式细胞术结果进一步表明, 人参皂苷 Rg_3 能够诱导胰腺癌细胞的程序性细胞死亡, 细胞凋亡是肿瘤治疗的重要策略之一, 人参皂苷 Rg_3 的促凋亡作用为其在胰腺癌治疗中的应用提供了理论依据; 此外, 在 Transwell 迁移和侵袭实验中, 人参皂苷 Rg_3 显著抑制胰腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

EMT 以上皮细胞特性丧失以及间质细胞特性获得为特征, 是肿瘤细胞具有迁移和侵袭能力的重要机制之一。已有研究表明, 人参皂苷 Rg_3 能够有效地抑制多种癌细胞 EMT, 从而抑制肠癌^[23]、肺癌^[24]、卵巢癌^[25]等细胞的增殖。研究表明, 人参皂苷 CK 可通过抑制 *N-cadherin* 和促进 *E-cadherin* 蛋

白的表达, 抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞的 EMT 进程^[7]。本研究发现, 人参皂苷 Rg_3 通过上调 *E-cadherin* 的表达和下调 *N-cadherin* 的表达, 显著抑制了 SW1990 细胞的 EMT 进程, EMT 的抑制不仅可以减少癌细胞的侵袭性, 还能降低其对化疗药物的耐受性^[26]。此外, 新生血管的形成在肿瘤的生长及其进展中均发挥着重要的作用, 缺氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF-2 α) 能够通过促进血管生成拟态的分子标志物 *VE-cadherin* 蛋白的表达, 从而促进胰腺癌血管生成拟态的形成^[9]。本研究发现, 人参皂苷 Rg_3 通过抑制 *VE-cadherin* 的表达, 抑制了胰腺癌细胞的血管生成拟态形成, 从而减少了肿瘤的血供, 表明人参皂苷 Rg_3 不仅能抑制胰腺癌细胞的增殖, 还能通过抑制其新生血管的形成以限制肿瘤的转移。为了进一步探讨人参皂苷 Rg_3 抑制胰腺癌血管生成拟态形成的分子机制, 本研究检测了人参皂苷 Rg_3 对 SW1990 细胞 PI3K 蛋白表达的影响。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, PI3K 通路在细胞增殖、迁移中起关键作用, 其激活常与多种癌症的进展和治疗抵抗相关^[27], 同时 PI3K 途径的激活能够诱导结直肠癌^[28]、胃癌^[29-30]及乳腺癌^[31]细胞 EMT 及血管生成拟态的形成。本研究发现, 人参皂苷 Rg_3 能够显著抑制胰腺癌细胞 PI3K 蛋白的磷酸化, 而 PI3K 途径激活剂 740 Y-P 则部分逆转了人参皂苷 Rg_3 对 SW1990 细胞增殖、迁移、侵袭及其对 EMT 和血管生成拟态进程的抑制作用, 表明人参皂苷 Rg_3 可通过调节 PI3K 通路发挥其抗胰腺癌的作用。

综上, 本研究发现人参皂苷 Rg_3 通过抑制 PI3K 的活性, 进而抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭以及 EMT 和血管生成拟态进程, 为胰腺癌的治疗提供了新的思路。未来的研究将进一步探讨人参皂苷 Rg_3 在体内模型中的抗肿瘤效果, 并探索其与其他抗癌药物的联合治疗效果; 同时, 人参皂苷 Rg_3 在不同胰腺癌细胞系中的作用机制以及其在临床应用中的安全性和有效性也需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hu J X, Zhao C F, Chen W B, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(27): 4298-4321.
- [2] Zhao C F, Gao F, Li Q W, et al. The distributional characteristic and growing trend of pancreatic cancer in China [J]. *Pancreas*, 2019, 48(3): 309-314.

- [3] Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395-412.
- [4] Nakhjavani M, Smith E, Townsend A R, *et al.* Anti-angiogenic properties of ginsenoside Rg₃ [J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 4905.
- [5] 徐子晨, 范子祥, 王文倩, 等. 人参皂苷抗乳腺癌分子机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6601-6610.
- [6] Zou J F, Su H F, Zou C L, *et al.* Ginsenoside Rg₃ suppresses the growth of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by upregulating lncRNA-CASC2 and activating PTEN signaling [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(6): e22480.
- [7] 崔江河, 韩光宇, 何光梅, 等. 人参皂苷 CK 联合 5-氟尿嘧啶对人胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、凋亡及上皮间质转化的影响 [J]. *中国药房*, 2017, 28(31): 4388-4392.
- [8] Song M Q, Bode A M, Dong Z G, *et al.* AKT as a therapeutic target for cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [9] Soler A, Figueiredo A M, Castel P, *et al.* Therapeutic benefit of selective inhibition of p110 α PI3-Kinase in pancreatic neuroendocrine tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(23): 5805-5817.
- [10] 张逸. 缺氧诱导因子 2 (HIF-2 α) 在胰腺癌中调控血管生成拟态 (VM) 的机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- [11] Wei X X, Chen Y H, Jiang X J, *et al.* Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 7.
- [12] Kuroczycki-Saniutycz S, Grzeszczuk A, Zwierz Z W, *et al.* Prevention of pancreatic cancer [J]. *Contemp Oncol*, 2017, 21(1): 30-34.
- [13] Kim J H, Lee S C, Oh S Y, *et al.* Attenuated folfinirox in the salvage treatment of gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer: A phase II study [J]. *Cancer Commun*, 2018, 38(1): 32.
- [14] Riaz M, Rahman N U, Zia-Ul-Haq M, *et al.* Ginseng: A dietary supplement as immune-modulator in various diseases [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 83: 12-30.
- [15] Fan J J, Wang Y S, You Y, *et al.* Fermented ginseng improved alcohol liver injury in association with changes in the gut microbiota of mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10(9): 5566-5573.
- [16] Chen H W, Yang H X, Deng J J, *et al.* Ginsenoside Rk₃ ameliorates obesity-induced colitis by regulating of intestinal flora and the TLR4/NF- κ B signaling pathway in C57BL/6 mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(10): 3082-3093.
- [17] 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.
- [18] 孙丹丹, 邹宜芳, 宋柳, 等. 人参皂苷 Rg₃ 诱导结肠癌细胞凋亡作用研究 [J]. *特产研究*, 2021, 43(5): 35-40.
- [19] Wang X F, He R, Geng L, *et al.* Ginsenoside Rg₃ alleviates cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting SOX2 and the PI3K/Akt/mTOR signaling axis by up-regulating miR-429 [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 823182.
- [20] Liang Y, Zhang T H, Jing S Y, *et al.* 20(S)-Ginsenoside Rg₃ inhibits lung cancer cell proliferation by targeting EGFR-mediated Ras/Raf/MEK/ERK pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(3): 753-765.
- [21] Peng Y F, Zhang R, Yang X, *et al.* Ginsenoside Rg₃ suppresses the proliferation of prostate cancer cell line PC3 through ROS-induced cell cycle arrest [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 1139-1145.
- [22] Zhao L Q, Sun W, Zheng A W, *et al.* Ginsenoside Rg₃ suppresses ovarian cancer cell proliferation and invasion by inhibiting the expression of lncRNA H19 [J]. *Acta Biochim Pol*, 2021, 68(4): 575-582.
- [23] Li X, Liu W, Geng C, *et al.* Ginsenoside Rg₃ suppresses epithelial-mesenchymal transition via downregulating notch-Hes1 signaling in colon cancer cells [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(1): 217-235.
- [24] Tian L L, Shen D C, Li X D, *et al.* Ginsenoside Rg₃ inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1619-1632.
- [25] Liu T, Zhao L, Zhang Y, *et al.* Ginsenoside 20(S)-Rg₃ targets HIF-1 α to block hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e103887.
- [26] Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84.
- [27] Noorolayi S, Shajari N, Baghbani E, *et al.* The relation between PI3K/Akt signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [28] Ma Z, Lou S P, Jiang Z. PHLDA2 regulates EMT and autophagy in colorectal cancer via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(9): 7985-8000.
- [29] Wang C, Yang Z, Xu E, *et al.* Apolipoprotein C-II induces EMT to promote gastric cancer peritoneal metastasis via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(8): e522.
- [30] Ding X S, Xi W Q, Ji J, *et al.* HGF derived from cancer-associated fibroblasts promotes vascularization in gastric cancer via PI3K/Akt and ERK1/2 signaling [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 1185-1195.
- [31] Nisar M A, Zheng Q, Saleem M Z, *et al.* IL-1 β promotes vasculogenic mimicry of breast cancer cells through p38/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 618839.

[责任编辑 李亚楠]