



# S型与R型人参皂苷Rh<sub>2</sub>对人肺腺癌A549 细胞增殖和凋亡的影响

张春晶, 于海涛\*, 侯金才

(齐齐哈尔医学院 生物化学与分子生物学教研室 生物遗传教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161042)

**[摘要]** 目的:探讨人参皂苷Rh<sub>2</sub>(S型与R型)对人肺腺癌A549细胞增殖和凋亡的影响,以阐述人参活性成分抗肿瘤活性的构效关系及可能机制。方法:采用MTT实验测定细胞增殖;碘化丙啶(PI)单染流式细胞仪分析细胞周期中各时期的细胞百分数,观察人参皂苷Rh<sub>2</sub>对人肺腺癌A549细胞增殖周期的影响。Annexin V-PI双染流式细胞术检测细胞凋亡,采用免疫荧光实验对作为细胞凋亡标志的Caspase-3活性进行测定。结果:人参皂苷Rh<sub>2</sub>对人肺腺癌A549细胞毒活性明显存在构效关系,其中25 mg·L<sup>-1</sup>的20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>和20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>作用48 h对肿瘤细胞株A549的增殖抑制率分别为28.5%,33.6%,IC<sub>50</sub>值分别为33.4,28.5 mg·L<sup>-1</sup>。20 mg·L<sup>-1</sup>的20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>作用A549细胞24 h后G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例显著高于对照组(P<0.01),S期细胞比例显著低于对照组(P<0.01),G<sub>2</sub>/M期细胞比例与对照组比较无显著性差异,说明20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>能阻滞细胞周期于G<sub>1</sub>期。30 mg·L<sup>-1</sup>的S型和R型人参皂苷Rh<sub>2</sub>作用A549细胞24 h后,无论是早期还是晚期凋亡率均明显高于正常组细胞(P<0.05),并且20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>组早期凋亡率明显高于20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>组,表现出明显的构效效应(P<0.05)。20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>和20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>作用6 h的A549细胞中标记Caspase-3活性的荧光亮度明显增强,说明Caspase-3的激活参与了人参皂苷Rh<sub>2</sub>诱导的A549细胞凋亡。结论:S型和R型人参皂苷Rh<sub>2</sub>均可剂量依赖性地抑制A549细胞增殖,并且20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>的抗肿瘤活性明显强于20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>,阻滞细胞周期于G<sub>1</sub>期,具有构效效应;S型和R型人参皂苷Rh<sub>2</sub>均具有促进A549细胞凋亡作用,并且20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>组早期凋亡率明显高于20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>组,具有构效效应。

**[关键词]** 人参皂苷Rh<sub>2</sub>;人肺腺癌A549细胞;细胞周期;凋亡

肺癌是一种严重影响人类生命健康的疾病之一,目前已成为世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤。目前,肺癌病因及发病机制尚未完全阐明,但从肿瘤细胞学来看,肺癌发生的本质在于细胞增殖与凋亡的调节失控。近年来中药的抗癌机制研究取得了很大进展,尤其对肺癌细胞增殖周期的调控与诱导细胞凋亡两方面内容。积极寻找特效和低毒的肿瘤防治药物成为当今我国乃至世界面临的紧迫任务之一。

近10多年来,有关人参皂苷抗肿瘤活性的研究取得了很大的发展。体内及体外抗肿瘤研究表明,具肿瘤细胞毒活性的人参皂苷多为一些人参次苷及苷

元,人参次苷及苷元的抗肿瘤临床价值已引起人们高度重视。人参皂苷Rh<sub>2</sub>(ginsenoside-Rh<sub>2</sub>, G-Rh<sub>2</sub>或Rh<sub>2</sub>)有C20位立体构型(S/R),20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>具有非器官特异性的广谱抗肿瘤作用,由于不同的肿瘤细胞具有不同的遗传背景,人参皂苷Rh<sub>2</sub>对不同的肿瘤细胞通过不同机制发挥作用<sup>[1-3]</sup>。但人参皂苷Rh<sub>2</sub>影响人肺腺癌A549细胞增殖和凋亡作用的构效关系评价,国内外尚未见报道,它们对肺癌细胞的作用靶点以及用于治疗肺癌的研究国内外报道甚少。本实验以人肺腺癌A549细胞为模型,对人参皂苷Rh<sub>2</sub>(S型与R型)的人肺腺癌A549细胞毒活性进行评价,探讨人参皂苷Rh<sub>2</sub>(S型与R型)对人肺腺癌A549细胞增殖和凋亡的影响,以阐述人参活性成分抗肿瘤活性的构效关系及可能机制。

## 1 材料

**1.1 药物和制剂** 20(S)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>,即20(S)-原人参二醇-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷和20(R)-人参皂苷Rh<sub>2</sub>,即20(R)-原人参二醇-3-O-β-D-吡喃葡萄糖

**[稿件编号]** 20100707005

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金和青年基金项目(D201027, QC2009C89);教育厅青年学术骨干项目(1251G073);齐齐哈尔市科技局项目

**[通信作者]** \*于海涛, E-mail: yht422@yahoo.com.cn

**[作者简介]** 张春晶,副教授,博士,主要从事中药抗肿瘤分子机制研究



昔购自中国药品生物制品检定所,本室提纯。A549细胞购自中国协和医科大学基础医学细胞中心。优质胎牛血清(Hyclone,美国),DMEM干粉(Gibco,美国),0.25%胰酶-0.02%EDTA(吉诺生物医药技术有限公司),噻唑蓝(MTT)、细胞周期检测试剂盒(中国上海贝博生物有限公司),Annexin V-PI双染试剂盒(普利莱公司),兔抗Cleaved Caspase-3(Cell signal公司),荧光Cy3-标记二抗(康为试剂),DAPI(Roche公司)。

**1.2 仪器** IX81倒置荧光显微镜(Olympus); FACS420流式细胞仪(COULTER EPICS® XL,美国Becton公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞常规培养** A549细胞培养于含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的DMEM培养基中,培养条件为37℃,5%CO<sub>2</sub>。用0.25%胰酶-0.02%EDTA消化,传代,取增殖旺盛、状态良好的细胞用于试验研究。

**2.2 MTT法检测肺癌细胞增殖** 消化收集对数生长期细胞,并调整成密度为 $1.5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个/mL的单细胞悬液,接种于96孔板,每孔100 μL,培养18~24 h。加入含有不同浓度人参活性成分的DMEM培养液100 μL,使终浓度分别为12.5,25,50,100 mg·L<sup>-1</sup>,实验同时设阴性对照组和空白对照组。阴性对照组为加有DMSO的DMEM完全培养液,每组6复孔,培养48 h,每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT 100 μL,继续培养4 h后,弃液,每孔加入DM-SO 150 μL,振荡器上轻摇10 min。用空白调零,自动酶标仪在570 nm波长处测出细胞对照组和各实验组的吸光度A,以每组6个孔的平均值作为各组的平均A,本实验重复3次。计算各实验组的抑制率 $= 1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ ,比较各个试验组在不同时相点对A549细胞的抑制率。采用SPSS 10.10统计分析软件,应用直线回归法计算IC<sub>50</sub>值。

**2.3 PI染色流式细胞术分析细胞周期分布** 取对数生长期A549细胞,以密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板内,2 mL/孔。37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养18~24 h。换成0.5%血清的DMEM,37℃继续孵育12 h,使细胞进入静止期。弃上清,实验分组:细胞对照组、DMSO助溶剂对照组和人参皂苷Rh<sub>2</sub>(S型或R型)组,培养24 h后,收集培养的细胞 $1.5 \times 10^6$  r·min<sup>-1</sup>离心8 min,悬浮于4℃预冷的200 μL PBS中,缓慢加入预冷的纯乙醇600 μL(70%),悬浮固

定细胞,4℃过夜。检测前用磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次。每一样本中加入100 μL RNase 37℃中孵育15 min。再加入200 μL碘化丙啶,室温下避光5 min。利用流式细胞仪分析细胞周期中各时期的细胞百分数。

**2.4 Annexin V-PI双染流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期A549细胞,以密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于6孔板内,每孔2 mL。37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。换成0.5%血清的DMEM,37℃继续孵育12 h,使细胞进入静止期。弃上清,实验分组:细胞对照组、DMSO助溶剂对照组和G-Rh<sub>2</sub>(S型或R型)组,培养24 h后,收集培养的细胞。细胞染色:加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞,加入5 μL Annexin V/FITC混匀后,加入5 μL Propidium Iodide,混匀。室温避光反应15 min,流式细胞仪上机分析。流式细胞仪检测,采用15 mW氩离子激光,激发光波长为488 nm,发射波长为530 nm,CELLQuest软件自动获取每样品 $1 \times 10^4$ 个细胞。流式细胞仪定量分析,计算annexin V-FITC及PI双染阳性细胞百分含量。

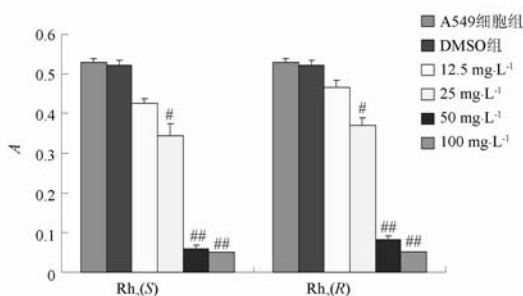
**2.5 免疫荧光实验检测Caspase-3活性** 取对数生长期A549细胞,以密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL接种于24孔板内,500 μL/孔。37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养18~24 h。弃上清,实验分组同上,每组3个复皿。培养6 h后,24孔板中A549细胞弃培养基,1×PBS缓冲液冲洗3遍,24孔板中A549细胞用含95%的乙醇固定10 min,预冷的PBS洗后放摇床上慢摇5 min。加入含0.1% TritonX-100的PBS穿透液,摇床慢摇10 min。PBS洗后室温慢摇5 min×3次。cleaved caspase家族蛋白抗体用PBST 1:200稀释,4℃过夜,PBS洗5 min×3次,慢摇。荧光Cy3标记二抗用PBST 1:200稀释,室温45 min;PBST洗5 min×5次,慢摇。1:500 DAPI室温复染5 min,封片并拍照。

**2.6 统计学处理** 计量资料的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行统计处理,组间差异采用t检验进行处理, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 人参皂苷Rh<sub>2</sub>对A549细胞增殖的抑制作用** 助溶剂DMSO阴性对照组A<sub>570</sub>与A549细胞对照组相比无明显改变。S型和R型-Rh<sub>2</sub>各剂量组与对照组相比,A<sub>570</sub>均明显下降( $P < 0.05$ )。25 mg·L<sup>-1</sup>的

20(R)-Rh<sub>2</sub> 和 20(S)-Rh<sub>2</sub> 作用 48 h 对肿瘤细胞株 A549 的增殖抑制率分别为 28.5%, 33.6%, IC<sub>50</sub> 分别为 33.4, 28.5 mg · L<sup>-1</sup>, 说明人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 具有抑制 A549 细胞增殖的作用, 并且该抑制作用呈剂量依赖性(图 1)。



与 A549 细胞组相比<sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

图 1 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 A549 细胞增殖的抑制作用

### 3.2 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 A549 细胞周期的阻滞作用

20 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(S)-Rh<sub>2</sub> 作用 24 h 可影响 A549 细胞周期各时相的分布, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例(78.2%)显著高于对照组(64.2%) ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例(13.1%)显著低于对照组(24.3%) ( $P < 0.01$ ), G<sub>2</sub>/M 期细胞比例(8.7%)与对照组(11.5%)比较无显著性差异。而 20 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(R)-Rh<sub>2</sub> 组 A549 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例 67%, S 期细胞比例 22.6%, G<sub>2</sub>/M 期细胞比例 10.4%, 均与对照组比较无显著性差异。比较 C-20 位各异构体的抗肿瘤活性, 可以看出, 20(S)-Rh<sub>2</sub> 能阻滞细胞周期于 G<sub>1</sub> 期(表 1)。

表 1 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用 24 h 对 A549 细胞周期各时相的影响

组别	细胞周期分布/%		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S
A549 细胞	64.2 ± 2.84	11.5 ± 1.22	24.3 ± 1.41
DMSO 阴性对照	65.2 ± 3.25	11.6 ± 0.98	23.2 ± 1.85
Rh <sub>2</sub> (R)20 mg · L <sup>-1</sup>	67.0 ± 4.41	10.4 ± 0.89	22.6 ± 1.99
Rh <sub>2</sub> (S)20 mg · L <sup>-1</sup>	78.2 ± 4.52 <sup>1)</sup>	8.7 ± 0.63	13.1 ± 0.95 <sup>2)</sup>

注: 与 A549 细胞组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.3 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 促进 A549 细胞凋亡作用

流式细胞分析仪检测结果显示, 30 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(R)-Rh<sub>2</sub> 和 20(S)-Rh<sub>2</sub> 作用 24 h 均可明显促进细胞凋亡, 且 S 型效果显著。定量分析结果表明(表 2), S

型和 R 型人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 组无论是早期还是晚期凋亡率均明显高于正常组细胞 ( $P < 0.01$ ), 并且 20(S)-Rh<sub>2</sub> 组早期凋亡率明显高于 20(R)-Rh<sub>2</sub> 组 ( $P < 0.05$ ), 说明人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 具有促进 A549 细胞凋亡作用, 并且具有构效效应。

表 2 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率
A549 细胞	4.39 ± 0.814	4.13 ± 0.622
DMSO 阴性对照	4.21 ± 0.725	4.06 ± 0.598
Rh <sub>2</sub> (R)30 mg · L <sup>-1</sup>	11.35 ± 0.841 <sup>1)</sup>	14.39 ± 0.899 <sup>1)</sup>
Rh <sub>2</sub> (S)30 mg · L <sup>-1</sup>	27.89 ± 1.526 <sup>1)</sup>	11.35 ± 0.634 <sup>1)</sup>

注: 与 A549 细胞组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

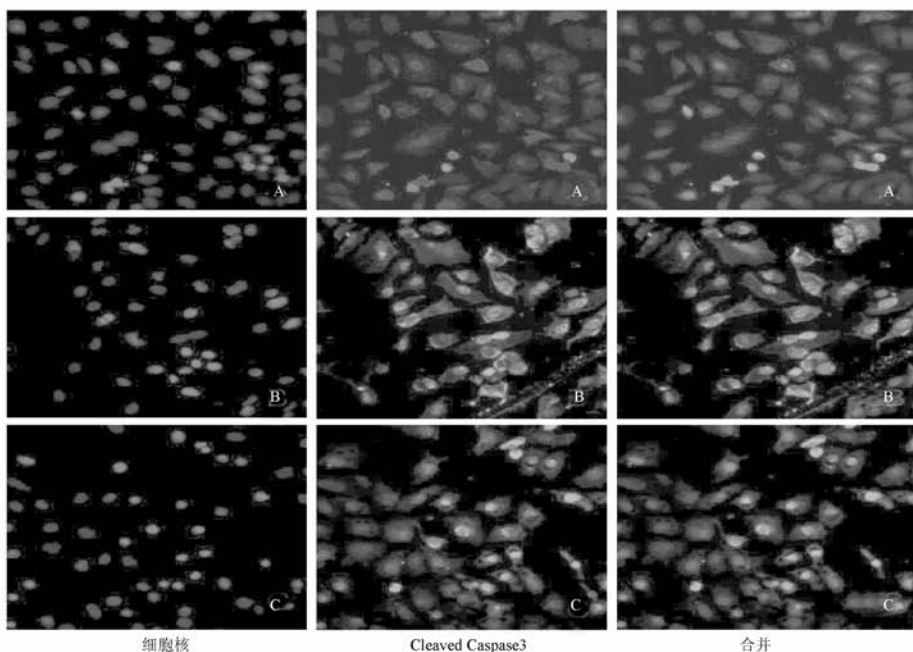
### 3.4 倒置荧光显微镜下观察 Caspase-3 活性

30 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(R)-Rh<sub>2</sub> 和 20(S)-Rh<sub>2</sub> 作用 6 h 的细胞中标记 Caspase-3 活性的荧光亮度明显增强。说明 Caspase-3 的激活参与了 Rh<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞凋亡(图 2)。

## 4 讨论

肿瘤的产生是丧失细胞机能调控的结果。生长信号的异常和细胞周期调控的异常将导致细胞增殖的异常, 最终产生恶性克隆。研究进展表明, 肿瘤共性的生物学特征是失控性生长, 其主要分子机制是细胞周期紊乱导致细胞增殖过多和凋亡过少。因此, 可以说肿瘤是细胞失控性生长所致的一类细胞周期性疾病。细胞周期调控的信号转导途径及其反馈环路上的一系列调节基因组成复杂的网络精确地调控细胞周期。肿瘤细胞的特征之一是异常增殖, 抑制肿瘤细胞的增殖是治疗肿瘤的途径之一, 也是抗肿瘤药物的基本要求。另外, 肿瘤细胞在不同程度上缺乏成熟的形态和完整的功能, 丧失某些终末分化细胞的性状, 并常对正常的分化调节机制缺乏反应。近年来, 细胞凋亡与肿瘤的关系日益受到重视, 认为正常细胞通过增殖和凋亡来维持自身稳定, 若两者失衡, 则可导致肿瘤发生, 因此诱导肿瘤细胞凋亡也是抗肿瘤的一种重要机制。

到目前为止, 已发现的具有肿瘤细胞毒活性的人参皂苷均为人参次苷和苷元, 并且抗肿瘤活性与化合物结构存在很大的关系。在抗肿瘤方面, 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub>、化合物 CK 和 20(S)-原人参二醇等人参次苷及苷元表现出明显的构效关系<sup>[4-6]</sup>。



A. A549 细胞组;B. Rh<sub>2</sub> (R) 组;C. Rh<sub>2</sub> (S) 组。  
图2 倒置荧光显微镜下观察 Caspase-3 活性(×100)

研究表明,20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的抗肿瘤作用与阻滞细胞周期有关,但其阻滞细胞周期的机制在不同的报道以及不同的细胞系中所得到的结果不尽相同。多种和 G<sub>1</sub> 期相关的细胞周期调节蛋白被 Rh<sub>2</sub> 所调节<sup>[1]</sup>, 结果导致 Rh<sub>2</sub> 诱导的 G<sub>1</sub> 期细胞生长受到阻滞, 最终导致细胞发生凋亡。在对人肺癌 A549 细胞的研究中, Cheng C C<sup>[2]</sup> 等发现, Rh<sub>2</sub> 调节多种 G<sub>1</sub> 期相关的细胞周期调节蛋白如 Cyclin-D1, Cyclin-E, CDK6 和 pRb, 导致 G<sub>1</sub> 期生长阻滞。而 DR4 死亡受体的上调在 Rh<sub>2</sub> 诱导的 A549 凋亡中扮演了关键的角色, 最终通过 Caspase-8/Caspase-3 外源性凋亡通路发生细胞凋亡, 而 Bcl-2 家族分子的水平却没有变化。周东波<sup>[3]</sup> 等却报道人参单体 Rh<sub>2</sub> 可通过上调 p53 和 Fas 及下调 Bcl-2 的表达、通过 Fas/FasL 系统途径诱导人肺腺癌 A549/DDP 细胞凋亡。不同的机制都表明, G-Rh<sub>2</sub> 可以通过影响细胞周期蛋白 (Cyclin) 和周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDK) 的表达调控 G<sub>1</sub>/S 期阻滞点, 引发 G<sub>1</sub> 期阻滞。

本实验的预试验结果表明, 没有转化的 5 个人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>3</sub>, Rg<sub>1</sub>, Re 和 Rd 对 A549 毒活性较弱, 其 IC<sub>50</sub> 值均大于 100 mg · L<sup>-1</sup>, 这和文献报道的鲜人参提取物没有抗肿瘤活性相一致。人参皂苷经降解后生成的人参次苷表现出明显的抗肿瘤

活性, 其中 25 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(R)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 及 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对肿瘤细胞株 A549 的增殖抑制率分别为 28.5%, 33.6%, IC<sub>50</sub> 分别为 33.4, 28.5 mg · L<sup>-1</sup>, 可以看出, 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗肿瘤活性较优于 20(R)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub>。本研究结果还显示 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 具有引发 G<sub>1</sub> 期阻滞而抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖及诱导凋亡的作用: 20 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用 24 h 可影响 A549 细胞周期各时相的分布, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例 (78.2%) 显著高于对照组 (64.2%) (P < 0.05), 而 20 mg · L<sup>-1</sup> 的 20(R)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 组 A549 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例 67%, 与对照组比较无显著性差异。30 mg · L<sup>-1</sup> S 型和 R 型人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用 24 h 后, 定量分析结果表明, S 型和 R 型人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 组无论是早期还是晚期凋亡率均明显高于正常组细胞, 并且 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 组早期凋亡率明显高于 20(R)-Rh<sub>2</sub> 组, 表现出明显的构效效应, 并且 20(R)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 和 20(S)-人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用 6 h 的 A549 细胞中标记 Caspase-3 活性的荧光亮度明显增强, 说明 Caspase-3 的激活参与了 Rh<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞凋亡。本实验结果与已有报道相一致<sup>[4]</sup>。但不同构型的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 究竟通过何种细胞信号转导通路干预肿



瘤细胞增殖和凋亡,不同构效的人参次苷对 MAPK/CDK 信号通路介导的肿瘤细胞增殖和凋亡的影响与其上游和下游信号传递过程有何关系,需要进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 吴歌,杨世杰.人参皂苷单体 Rh<sub>2</sub> 对小鼠前胃癌 MFC 细胞的增殖抑制作用[J].吉林大学学报:医学版,2008,34(1):101.  
[2] Cheng C C, Yang S M, Huang C Y, et al. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh<sub>2</sub>-mediated G(1) growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55(6): 531.

[3] 周东波,胡成平,苏晓丽.人参单体 Rh<sub>2</sub> 诱导人肺腺癌 A549/DDP 细胞凋亡的体外研究[J].中国肺癌杂志,2005,8(4):257.  
[4] Popovich D G, Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line[J]. Arch Biochem Biophys, 2002,406(1):1.  
[5] 马成俊.半合成稀有人参皂苷及抗肿瘤构效关系的研究[D].北京:中国科学院,2005.  
[6] 李绪文.人参皂苷降解及其产物化学成分的研究[D].长春:吉林大学,2006.

## Effects of 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> and 20(R)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> on proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells

ZHANG Chunjing, YU Haitao\*, Hou Jincai

(Department of Biology Genetics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate and explore the effects of 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> and 20(R)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> on the cytotoxicity, proliferation and the apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells, and to illustrate the structure-activity relationship and possible mechanisms of anti-tumor active ingredients of ginseng. **Method:** A549 cells were treated with different concentration gradient of ginsenoside Rh<sub>2</sub> (S and R structure) and incubated for different time. Cell proliferation and cytotoxicity studies were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay, cell cycle and apoptotic was analyzed by PI stains and combination of Annexin V/Propidium iodide double staining with flow cytometric analysis. The influences of activation on Caspase-3 were also detected by the immunofluorescence staining with fluorescence microscope. **Result:** MTT test indicated that ginsenoside Rh<sub>2</sub> had a strong cytotoxicity activity to A549 cells. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> could obviously inhibit the cell proliferation in human lung adenocarcinoma cell line A549 at the effective doses of 25 mg · L<sup>-1</sup> treated with 48 h. The inhibition ratio and the value of IC<sub>50</sub> for 48 h of 20(R)-Rh<sub>2</sub> and 20(S)-Rh<sub>2</sub> were respectively 28.5%, 33.6% and 33.4, 28.5 mg · L<sup>-1</sup>. The inhibition of ginsenoside Rh<sub>2</sub> to A549 showed structure relationship significantly, time-dependent and concentration-dependent. Flow cytometric analysis (FACS) with PI stains analysis results showed that the proportion of A549 cells in G<sub>1</sub> phase increased, while the number of cells in S phase decreased significantly and those in G<sub>2</sub> phase reduced slightly. This result indicated structure relationship significantly, especially in the 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> inhibited the proliferation of A549 cell dramatically and retarded A549 cell cycle at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. The immunofluorescent of combination with Annexin V/FITC/PI by flow cytometric suggested ginsenoside Rh<sub>2</sub> can induce inchoate apoptosis rate and late apoptosis rate of A549 cell significantly. All the results showed structure relationship significantly, especially in the 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub>. The immunofluorescent with fluorescence microscope suggested the activity of Caspase-3 were enhanced after ginsenoside Rh<sub>2</sub> treated. **Conclusion:** 20(R) and 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> had a significant inhibitory effect on the proliferation. Compared with 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub>, 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> has been shown to have significant anticancer effects and to be capable of blocking cell proliferation and causing G<sub>1</sub> phase arrest in human lung adenocarcinoma A549 cells. 20(R) and 20(S)-ginsenoside Rh<sub>2</sub> have been shown to have anticancer effects and to be capable of increasing inchoate apoptotic rate, reducing apoptotic rate significantly, enhancing the activity of Caspase-3 and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells.

[Key words] ginsenoside Rh<sub>2</sub>; human lung adenocarcinoma cell line A549; cell cycle; apoptosis

doi:10.4268/cjcmm20111228

[责任编辑 张宁宁]