

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.11.004

人参皂苷 Rg3 对人鼻咽癌 HNE-1 细胞增殖和血管生成的影响

王鸿彪¹, 林英城¹, 林 雯¹, 曾 德¹, 陈炯玉², 林文照¹, 洪超群²

Anti-proliferative and Anti-angiogenic Effects of Ginsenoside Rg3 on Human Nasopharyngeal Carcinoma HNE-1 Cell Line

WANG Hong-biao¹, LIN Ying-cheng¹, LIN Wen¹, ZENG De¹, CHEN Jiong-yu², LIN Wen-zhao¹, HONG Chao-qun²

1. Department of Medical Oncology, Cancer Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515031, China, 2. Department of Cancer Center Laboratory

Corresponding Author: LIN Ying-cheng, E-mail: linyingcheng@medmail.com.cn

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of Ginsenoside Rg3 on proliferation, migration and *in vitro* angiogenesis of human nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cells. **Methods** The proliferative activity, migration and tube-like structures (TLSs) formation of HNE-1 cells, cultured in medium with different concentration of Ginsenoside Rg3, were determined by MTT assay, wound healing assay and *in vitro* anti-angiogenic test, respectively. Anti-angiogenic test was based on preliminary experiment on the observation of TLSs formed by HNE-1 cells on Matrigel and their structural characteristics.

Results Ginsenoside Rg3 had anti-proliferative effect both in HNE-1 and CRL-2480 cells at the concentrations of 50, 100 and 200 μg/ml, which was dose-dependent but not time-dependent, and neither of them has statistical significance ($P > 0.05$). Ginsenoside Rg3 could significantly decrease the migration velocity of HNE-1 cells at the concentrations of 25, 50, 100 and 200 μg/ml, of which the differences were all statistically significant compared with control group ($P < 0.01$), and the effect was negatively correlated with the concentration of Ginsenoside Rg3 ($r = -0.964$; $P < 0.001$). HNE-1 cells could form TLSs on matrigel. Ginsenoside Rg3 could inhibit the formation of TLSs of HNE-1 cells, and the number of tubule was negatively correlated with the concentration of Ginsenoside Rg3 ($r = -0.928$; $P < 0.01$).

Conclusion Ginsenoside Rg3 has certain anti-proliferative effect on HNE-1 cells. HNE-1 cells could form TLSs on matrigel. Ginsenoside Rg3 can inhibit the migration and vasculogenic mimicry of HNE-1 cells.

Key words: Human nasopharyngeal carcinoma (NPC); Vasculogenic mimicry; Ginsenoside Rg3

摘要: 目的 研究人参皂苷 Rg3(ginsenoside Rg3) 对人鼻咽低分化鳞癌 HNE-1 细胞的增殖、迁移及体外血管生成的影响。**方法** 用不同浓度人参皂苷 Rg3 处理 HNE-1 细胞, MTT 法检测 HNE-1 细胞增殖活性; 创伤修复实验检测细胞迁移能力; 观察 HNE-1 细胞能否在 Matrigel 上形成血管网状结构及其特点; 体外管道形成抑制试验检测不同浓度人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞管道形成能力的影响。**结果** 不同浓度人参皂苷 Rg3(50、100、200 μg/ml) 对 HNE-1、CRL-2480 细胞均有一定的增殖抑制作用, 呈浓度依赖性趋势, 无时间依赖性, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 人参皂苷 Rg3(25、50、100、200 μg/ml) 可以显著降低 HNE-1 细胞迁移速度, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 与浓度呈负相关 ($r = -0.964$; $P < 0.001$); HNE-1 细胞在 Matrigel 上培养能形成血管网状样结构; 人参皂苷 Rg3 能抑制 HNE-1 细胞体外管道形成 ($P < 0.01$), 其管状结构数量与人参皂苷 Rg3 浓度呈负相关 ($r = -0.928$; $P < 0.01$)。 **结论** 人参皂苷 Rg3 有一定的抗 HNE-1 细胞增殖作用; HNE-1 细胞具有血管生成拟态; 人参皂苷 Rg3 能够抑制 HNE-1 细胞的迁移和体外血管生成拟态的形成。

成拟态; 人参皂苷 Rg3 能够抑制 HNE-1 细胞的迁移和体外血管生成拟态的形成。

关键词: 鼻咽癌; 血管生成拟态; 人参皂苷 Rg3

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)11-1226-04

收稿日期: 2009-09-04; **修回日期:** 2010-01-27

基金项目: 广东省中医药管理局资助课题(1040101)

作者单位: 1. 515031 广东汕头, 汕头大学医学院附属肿瘤医院内科, 2. 中心实验室

通信作者: 林英城, E-mail: linyingcheng@medmail.com.cn

作者简介: 王鸿彪(1976-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤内科治疗工作

0 引言

研究发现一些高度恶性、侵袭性肿瘤细胞具有模拟内皮细胞能力,相互连接形成血管样网状结构,称之为肿瘤血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)^[1]。这些新的肿瘤血管壁的均一性、弹性和通透性与正常血管不同^[2],有利于肿瘤细胞的快速生长和转移。体内外实验研究表明人参皂苷 Rg3 有诱导肿瘤细胞的凋亡,抗肿瘤细胞黏附、侵袭和转移,抑制肿瘤新生血管形成等作用^[3-5]。本研究进一步探索人参皂苷 Rg3 对人鼻咽癌 HNE-1 细胞体外增殖、迁移和肿瘤血管生成的影响,并观察 HNE-1 细胞体外形成血管网状结构的能力和特点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人鼻咽低分化鳞癌 HNE-1 细胞系,中南大学肿瘤研究所提供;人脐静脉内皮 CRL-2480 细胞系,汕头大学医学院提供。新生牛血清购自武汉三利生物制品厂;DMEM 培养液为美国 Gibco 公司产品;胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;人工基质 Matrigel 购自威格拉斯(Vigorous)生物技术(北京)有限公司;粉剂人参皂苷 Rg3 标准品(纯度≥98.64%)购自大连富生制药有限公司;二甲基亚砜(DMSO),购自美国 AMRESCO 公司,助溶人参皂苷 Rg3 的 DMSO 终浓度是 0.10%。

1.2 MTT 法检测人参皂苷 Rg3 抗 HNE-1 细胞和 CRL-2480 细胞的增殖活性

取对数生长期 HNE-1 细胞、CRL-2480 细胞常规消化,分别接种于 96 孔板,每孔 200 μ l、含 2×10^3 个细胞,贴壁培养 24h 后,每孔加含人参皂苷 Rg3 终浓度分别为 0、50、100、200 μ g/ml 的 DMEM 培养液,并设空白对照组。每组设 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱,分别培养 24、48、72h,后弃去培养液,加 5mg/ml MTT 20 μ l/孔,培养 4h,吸弃上清液,加入 DMSO 150 μ l/孔终止反应,微振荡器振荡 10min,Stat Fax-2100 酶标仪 490nm 波长处测定吸光度值(OD 值)。实验重复 3 次。

1.3 创伤修复实验检测细胞迁移

取 200 μ l 含 5×10^4 个 HNE-1 细胞接种于 96 孔板,约 90%融合生长后,用 200 μ l 移液器枪头在孔的底部中央划“一”字形划痕,用 0.9%氯化钠溶液洗去损伤脱落细胞 2 次。每孔加含人参皂苷 Rg3 终浓度分别为 0、25、50、100、200 μ g/ml 无含牛血清的 DMEM 培养液,每组设 4 个复孔,即刻摄像记录。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 24h 后,取出孔板,按标记再次于同一视野分别摄像记录。用“电子尺”软件分别测量每组 0h、24h 划痕两侧细胞间的

距离,用 0h 划痕边缘的距离减去 24h 迁移边缘的距离,取 4 次测量平均值表示迁移距离。实验重复 4 次。细胞迁移速度 = 迁移距离 \div 迁移时间。

1.4 体外管道形成实验

将已预冷 Matrigel 胶和无含血清的 DMEM 培养液(0~4 $^{\circ}$ C),按 1:1 比例快速充分混合后加入 96 孔板,每孔 45 μ l,平整铺于孔底,室温下风干 30min、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养温箱凝固、过夜;取生长期的 HNE-1 和 CRL-2480 的单细胞悬液,分别接种到已包被 Matrigel 胶的 96 孔板上,每孔 5×10^3 个细胞;继续培养 24h;每隔 4h 观察细胞管状排列情况及完整程度,24h 后终止培养,显微镜下($\times 40$)随机取上、下、左、右、中心 5 个视野并拍照,计数 5 个视野的管状结构总个数,重复实验 3 次。终止管道形成后,弃上清液、PBS 洗、4%多聚甲醛固定、苏木精染色,光学显微镜下观察、拍照。

1.5 体外管道形成抑制实验

在已包被 Matrigel 胶(方法同上)的 96 孔板中,每孔分别加入 100 μ l 含 5×10^3 个 HNE-1 细胞,每孔加入 100 μ l 不同浓度人参皂苷 Rg3 (0、50、100、200 μ g/ml)含 10%牛血清的 DMEM 培养液,细胞管状结构培养、观察、拍照、计数及染色步骤同上。

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行分析,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),相关性比较采用 Pearson 分析方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞的增殖抑制作用

不同浓度人参皂苷 Rg3 与 2×10^3 个 HNE-1 细胞共同培养后,能抑制 HNE-1 细胞的增殖,其抑制作用随人参皂苷 Rg3 浓度的升高而增强趋势。不同时间、不同浓度的人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞的增殖抑制作用,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

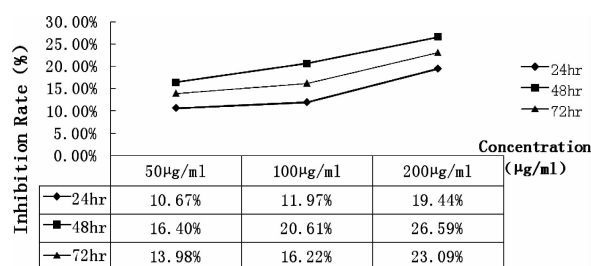


图 1 不同浓度人参皂苷 Rg3 作用 24h~72h 对 HNE-1 细胞生长的抑制作用(MTT 法)

Figure 1 The inhibitory effect of different concentration of Ginsenoside Rg3 in HNE-1 cells for 24h~72h(MTT assay)

2.2 不同浓度人参皂苷 Rg3 对 CRL-2480 细胞的增殖抑制作用

不同浓度人参皂苷 Rg3 与 2×10^3 个 CRL-2480 细胞共同培养后,能较弱抑制 CRL-2480 细胞的增殖,有浓度依赖性趋势,但无时间依赖性,见图 2。

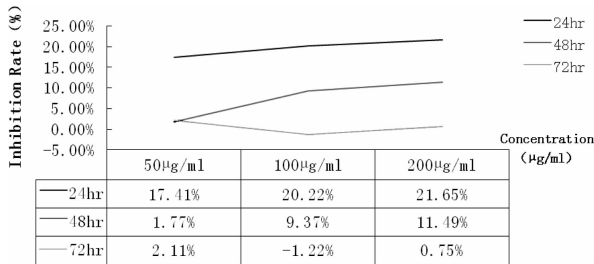


图 2 不同浓度人参皂苷 Rg3 作用 24h~72h 对 CRL-2480 细胞生长的抑制作用(MTT 法)

Figure 2 The inhibitory effect of different concentration of Ginsenoside Rg3 in CRL-cells for 24h~72h (MTT assay)

2.3 不同浓度人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞迁移能力的影响

不同浓度人参皂苷 Rg3 对鼻咽癌 HNE-1 细胞迁移能力的作用,平均迁移速度与人参皂苷 Rg3 浓度呈负相关($r = -0.964; P < 0.001$),见表 1。

2.4 HNE-1 细胞及 CRL-2480 细胞体外管道形成实验

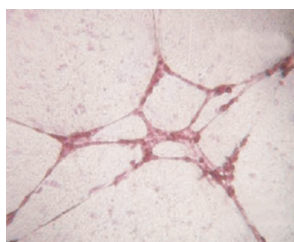
CRL-2480 细胞能够在人工基底膜胶上形成小管样结构,相互交织成网,见图 3。而 HNE-1 细胞能够模拟血管内皮细胞的特性,出现长梭形的细胞形态,细胞之间互相连接,24h 后形成血管网状样结构,形成过程与内皮细胞相似,见图 4a。

表 1 人参皂苷 Rg3 作用 HNE-1 细胞 24h 的平均迁移速度

Table 1 The average migration velocity of HNE-1 cells cultured in various concentration of Ginsenoside Rg3 for 24h

Ginsenoside Rg3 (μg/ml)	$\bar{x} \pm s$
25	$0.521 \pm 0.064^{\star\Delta}$
50	$0.412 \pm 0.054^{\star\Delta}$
100	$0.305 \pm 0.022^{\star\Delta}$
200	$0.216 \pm 0.016^{\star\Delta}$
Control group	0.713 ± 0.048

Note: the control group cultured in DMEM (free of 10% bovine serum). $\star: P < 0.001$ vs. control group; $\Delta: P < 0.01$ The inter-group comparison of migration velocity cultured in medium with four concentrations of Ginsenoside Rg3



control group

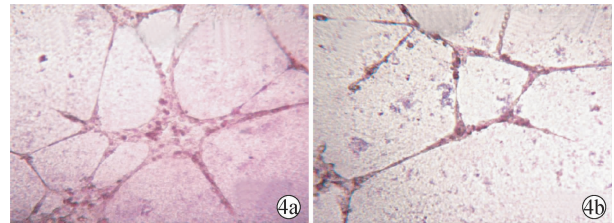
图 3 CRL-2480 细胞体外管道形成实验(24h, ×100)

Figure 3 The in vitro tube-like structure formation test of CRL-2480 cells(24h, ×100)

2.5 HNE-1 细胞体外管道形成抑制实验

对照组所形成的管道结构排列整齐且较多而完整,呈单个环状或多个环相连的网格状;经不同浓度人参皂苷 Rg3 处理的 HNE-1 细胞在 Matrigel 胶上形成的小管样结构数目较对照组减少,且环状结构断裂,见图 4b。

HNE-1 细胞经不同浓度人参皂苷 Rg3 处理后管道形成的数目与人参皂苷 Rg3 浓度呈负相关($r = -0.928; P < 0.01$),见表 2。



4a: control group; 4b: Rg3 200μg/ml

图 4 HNE-1 细胞体外管道形成及抑制实验(24h, ×100)

Figure 4 The in vitro tube-like structure formation and suppression test of HNE-1 cells(24h, ×100)

表 2 Ginsenoside Rg3 与 HNE-1 细胞管道个数的关系

Table 2 The relationship between the concentration of Ginsenoside Rg3 and the number of TLSs formed by HNE-1 cells

Ginsenoside Rg3(μg/ml)	$\bar{x} \pm s$
50	$55.000 \pm 11.916^{\star\Delta}$
100	$39.750 \pm 7.932^{\star\Delta}$
200	$24.500 \pm 6.245^{\star\Delta}$
Control group	75.500 ± 6.856

Note: the control group cultured in DMEM (with 10% bovine serum). $\star: P < 0.01$ vs. control group; $\Delta: P < 0.05$ The inter-group comparison of the number of TLSs cultured in medium with three concentrations of Ginsenoside Rg3

3 讨论

本研究 MTT 法体外检测结果显示:不同浓度人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞、CRL-2480 细胞均有较弱的抗增殖作用,有浓度依赖性趋势,无时间依赖性,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与文献报道^[6]人参皂苷 Rg3 对肺腺癌 A549 细胞、血管内皮细胞的增殖抑制作用不明显大致相同,认为人参皂苷 Rg3 抑制肿瘤细胞生长主要可能是通过调节影响血管生成因子的表达而发挥抗肿瘤作用,而不是直接的细胞毒作用。但也有研究认为人参皂苷 Rg3 对前列腺癌 LNCaP 和 PC3、小鼠肝癌 H₂₂ 细胞、B16 黑色素瘤细胞等有明显增殖抑制作用及凋亡诱导作用等,其抑制肿瘤细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用程度呈剂量、时间依赖性,主要作用于细胞增殖周期的 G₂ → M 期,从而起到抗肿瘤作用^[7-8]。不同实验结果

的差异,可能与肿瘤细胞的病理类型、分化程度、培养环境和药物的处理方式、浓度及作用时间等有关。

体外迁移结果显示:人参皂苷 Rg3 能够显著降低 HNE-1 细胞的体外迁移能力,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.001$),不同浓度组之间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),而且浓度与迁移速度呈负相关($r = -0.964, P < 0.001$)。与文献报道人参皂苷 Rg3 能抑制 SMMC-7721 细胞在 FN 上的迁移运动,而且这种作用随剂量的增加而增强,且与作用时间呈正相关结果大致相仿^[9]。创伤修复实验结果表明:人参皂苷 Rg3 通过抑制 HNE-1 细胞的迁移能力,从而降低肿瘤细胞通过血管或淋巴管转移及局部浸润的机会,减少远处转移及局部复发。

本研究发现 HNE-1 细胞体外能够模拟血管内皮细胞的特性,在 Matrigel 胶上形成小管样结构,称之为血管生成拟态。说明 HNE-1 细胞可能具有内皮细胞的某些功能和生物学行为特征,即“可塑性(Plasticity)”。这与文献报告高度恶性、侵袭性的肿瘤细胞能够形成血管生成拟态,并且具有可塑性的特征相一致^[10-11]。恶性肿瘤细胞能够模拟内皮细胞形成血管生成拟态的机制仍未完全明确。目前研究主要集中在肿瘤细胞本身所具有的遗传学特征、血管结构自身特点及其周围微环境等方面。研究认为^[12-13]与内皮相关基因 VE-cadherin、EphA2、Laminin5 γ 2、MMP-2、PI3K、HIF-1 α 、NOTCH 和 Mig-7 等蛋白的生物活性有关。

HNE-1 细胞形成的小管样结构经不同浓度的人参皂苷 Rg3 药物干预后,其小管样结构形成明显受到抑制,而且环状结构断裂、不完整,高浓度组作用最明显,表明人参皂苷 Rg3 能够抑制 HNE-1 细胞血管形成能力,且有明显的剂量依赖性。与文献报道^[14-15]Thalidomide、Endostar 分别抑制恶性黑色素瘤 B16F10 细胞、鼻咽癌 HNE-1 细胞血管生成拟态的结果相符。

综上所述,人参皂苷 Rg3 对 HNE-1 细胞及 CRL-2480 细胞有一定的抗增殖作用,能显著抑制 HNE-1 细胞体外迁移能力。HNE-1 细胞能够在人工基底膜胶上形成小管样结构;而且经人参皂苷 Rg3 作用后,管道形成减少,环状结构不完整。其抑

制 HNE-1 细胞肿瘤血管形成的作用机制还有待进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 739-752.
- [2] Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis-not all blood vessels are created equal[J]. N Engl J Med, 2004, 351(3): 215-216.
- [3] 段迎春,胡平,黄光荣,等. 顺铂联合人参皂苷 Rg3 对荷宫颈癌鼠血管生成的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(4): 290-293.
- [4] Yue PY, Wong DY, Wu PK, et al. The angiostatic effects of 20(R)-ginsenoside Rg3[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(4): 437-445.
- [5] 李杰,宋淑霞,吕占军. 人参皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(1): 61-63.
- [6] 陈明伟,杨岚,倪磊,等. Rg3 对人肺腺癌 A549 细胞及其内源性 VEGF 的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2006, 37(1): 60-62.
- [7] Kim HS, Lee EH, Ko SR, et al. Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(4): 429-435.
- [8] Chen J, Peng H, Ou-Yang X, et al. Research on the antitumor effect of ginsenoside Rg3 in B16 melanoma cells[J]. Melanoma Res, 2008, 18(5): 322-329.
- [9] 华海清,沈小昆,秦叔逵,等. 人参皂苷 Rg3 抗人肝癌细胞株侵袭和转移的实验研究[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(4): 326-330.
- [10] Folberg R, Arbivia Z, Moses J, et al. Tumor cell plasticity in uveal melanoma: microenvironment directed dampening of the invasive and metastatic genotype and phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns [J]. Am J Pathol, 2006, 169(4): 1376-1389.
- [11] Zhao H, Gu XM. Study on vasculogenic mimicry in malignant esophageal stromal tumors[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(15): 2430-2433.
- [12] Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(2): 228-233.
- [13] 高启龙,陈永强. 肿瘤血管生成拟态分子机制及临床意义[J]. 国际骨科学杂志, 2006, 27(5): 264-267.
- [14] Zhang S, Li M, Gu Y, et al. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27(1): 60-68.
- [15] 曾德,林英城,王鸿彪,等. 重组人血管内皮抑制素对鼻咽癌 HNE-1 细胞体外血管生成拟态的抑制作用[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(6): 481-484.

[编辑:贺文;校对:周永红]