

REFERENCES

- [1] SHANNON A M, BOUCHIER-HAYERS D J, CONDRON C M, et al. Tumor hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29(4): 297-307.
- [2] SEMENZA G L, AGANI F, BOOTH G, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Kid Int*, 1997, 51(2): 553-555.
- [3] LIN C, MCGOUGH R, ASWAD B, et al. Hypoxia induces HIF-1 alpha and VEGF expression in chondrosarcoma cells and chondrocytes [J]. *J Orthop Res*, 2004, 22(6): 1175-1181.
- [4] MONGE A, PALOP J A, CERAIN A L, et al. Hypoxia-selective agents derived from Quinoxaline 1,4-di-N-oxides [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(10): 1786-1192.
- [5] MONGE A, MARITINEZERESPO F J, DECERAIN A L, et al. Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1, 4-di-N-oxides [J]. *J Med Chem*, 1995, 38(22): 4488-4494.
- [6] WENG Q, ZHANG J, CAO J, et al. Q39, a quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative, inhibits hypoxia-inducible factor-1 alpha expression and the Akt/mTOR/4E-BP1 signaling pathway in human hepatoma cells [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(6): 1177-1187.
- [7] WENG Q, WANG D, GUO P, et al. Q39, a novel synthetic Quinoxaline 1,4-di-N-oxide compound with anti-cancer activity in hypoxia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 581(3): 262-269.
- [8] BROWN J M. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Mol Med Today*, 2000, 6(4): 157-162.
- [9] FELSDER D, AGANI F, IYER N V, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and insulin-like growth factor 2 [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16): 3915-3918.
- [10] CHANG L, KARIN M. Mammalian MAP kinase signaling cascades [J]. *Nature*, 2001(410): 37-40.
- [11] NOZAKI K, NISHIMURA M, HASHIMOTO N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 23(1): 1-19.

收稿日期: 2012-11-22

人参皂苷 Rg3 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和侵袭的影响

陈云, 张竝, 俞勇, 金冶(浙江省立同德医院, 杭州 310012)

摘要: 目的 观察人参皂苷 Rg3 对雌激素受体阳性的乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和侵袭的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法 采用 MTT 法检测细胞的增殖能力, 流式细胞仪分析细胞周期分布以及凋亡比率, 通过 Transwell 小室观察细胞侵袭力, RT-PCR 法检测细胞中的 MMP-9 mRNA 的表达。结果 与对照组相比, 人参皂苷 Rg3 能显著抑制 MCF-7 细胞的增殖; G₀/G₁ 期及 S 期细胞比例减少, 而 G₂/M 期细胞比例显著增加; 同时细胞凋亡比率亦明显提升, 而细胞侵袭指数降低, 且呈现良好的剂量、时间依赖性。同时人参皂苷 Rg3 还能显著抑制细胞中 MMP-9 mRNA 的表达水平($P < 0.05$)。结论 人参皂苷 Rg3 能抑制 MCF-7 细胞的增殖和侵袭, 其作用机制可能与其能降低 MMP-9 基因的表达有关。

关键词: 人参皂苷 Rg3; 乳腺癌; 基质金属蛋白酶-9; 细胞侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)07-0722-04

Effect of Ginsenoside Rg3 on Cell proliferation and Invasion of Breast Cancer MCF-7 Cell Line

CHEN Yun, ZHANG Bing, YU Yong, JIN Ye(*Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of ginsenoside Rg3 on cell proliferation and invasion of estrogen receptor(ER) positive breast cancer MCF-7 cell line and the potential mechanism. **METHODS** The proliferation of MCF-7 cell was detected by MTT assay. Cell cycle and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry. The effect on cell invasion was assayed by using the transwell methods. The expression of MMP-9 mRNA in MCF-7 cell was analyzed with the RT-PCR. **RESULTS** Compared with the control group, ginsenoside Rg3 could significantly inhibit the proliferation of MCF-7 breast cancer cells. The cell cycle of MCF-7 was also changed after treated with the ginsenoside Rg3. The percentage of cells in G₀/G₁ and S phase were decreased, whereas the percentage of cells in G₂/M was increased significantly. ginsenoside Rg3 could also induce the MCF-7 cell apoptosis and decrease the index of cell invasion on a time and dose-depended manner. Meanwhile, ginsenoside Rg3 could significantly suppress the expression of MMP-9 mRNA on MCF-7 cell($P < 0.05$). **CONCLUSION** ginsenoside Rg3 could inhibit the proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cell line, the underlying mechanism may be related with the inhibitory effect of ginsenoside Rg3 on MMP-9 mRNA expression in MCF-7 cell.

KEY WORDS: ginsenoside Rg3; breast cancer; MMP-9; cell invasion

作者简介: 陈云, 男, 主治医师 Tel: 13575475531 E-mail: cloucd0405@163.com

乳腺癌的发病率居高不下,发病年龄趋于年轻化,是危害妇女健康的常见恶性肿瘤。而普通的化疗药物有较强的毒副作用并易产生抗药性。因此,来源于动、植物的天然化合物成为研究抗癌药物的主要方向,而传统的中药亦越来越受到大家的青睐^[1]。人参皂苷 Rg3 是从人参根的浸出液中分离出的一种有效单体成分,实验证实人参皂苷 Rg3 能抑制动物体内移植肿瘤的生长、浸润和转移,包括肺癌、胃癌、黑色素瘤、胰腺癌和肝癌等,且对骨髓、心、肺、肝、肾和神经系统无毒副作用^[2]。本研究则观察了人参皂苷 Rg3 对雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和侵袭的影响,并初步探讨其可能的作用机制,为乳腺癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雌激素受体阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞购于中科院上海细胞所,培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,取对数生长期的细胞进行实验。人参皂苷 Rg3 购于南京替斯艾么中药研究所,纯度 99.23%,二甲基亚砜(DMSO)助溶,DMSO 终浓度<0.1%,用完全培养基配制成 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储存液,抽滤除菌后分装,保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。MTT 购自美国 Sigma 公司,DMEM 培养基购自 HyClone 公司,10%胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 MTT 法分析细胞增殖

取对数生长期细胞,消化后,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液配制成单个细胞悬液,调节细胞浓度为 (1×10^5) 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。接种于 96 孔板中,每孔 200 μL 。实验组各加入不同浓度的人参皂苷 Rg3,使其终浓度分别为 37.5, 75, 150, 300, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,每种浓度设 6 个复孔,同时设立 DMSO 溶剂对照组。分别在加药后 24, 48, 72 h,每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,37%继续培养 4 h 后弃上清液,加入 150 μL DMSO,摇床上振荡 10 min 使蓝紫色结晶充分溶解,用酶标仪于 570 nm 处测定每孔吸光度($A_{570\text{nm}}$)值,细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 $A_{570\text{nm}}$ / 对照组 $A_{570\text{nm}}$) \times 100%。采用 IC_{50} 计算软件(来源于中科院上海药物研究所)计算人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 值。

1.3 细胞周期分布及细胞凋亡率分析

取对数生长期的细胞,用 37.5, 75, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的人参皂苷 Rg3 分别作用 48 h 后,消化分离为 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,离心沉淀后用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 液洗涤 3 次,70%酒精固定 30 min,10 mL 的 1%浓度 Triton X-100 处理 10 min,0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Rnase 1 mL 处理 10 min,采用 Annexin-V 和碘化丙啶(PI)双染色法进行染色,并利用美国 Coulter 公司 Elite ESP 型流式细胞仪分析细胞周期分布情况和细胞凋亡率。

1.4 细胞侵袭力观察

将上述各含药培养液处理 48 h 后的细胞制成 3×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单个细胞悬液,按 100 $\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 加入 Transwell 小室上室,下室加入 500 μL 培养液,按说明操作。以穿过无 Matrigel 胶的微孔滤膜细胞数为对照,各组穿过 Matrigel 胶的细胞数与其相比所得百分率表示癌细胞的侵袭指数。

1.5 RT-PCR 法检测细胞 MMP-9 mRNA 表达水平

按 Trizol RNA 提取试剂盒的说明,提取总 RNA。收集沉淀的核酸,用 75%的冷乙醇洗涤 2 次,室温干燥,以适量的 0.1% DEPC 水溶解。用 DNA/RNA 紫外检测仪测定其含量和纯度。按实验室常规操作,在 MMLV 逆转录酶作用下,制备 cDNA。在 Taq 酶的作用下,各取 cDNA 4 μL 进行扩增。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,35 次循环,所得的扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳,100 V,25 min。利用凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)成像,进行半定量分析,以 GAPDH 管家基因作为内参。

1.6 数据统计分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $n=3$ 。采用 SPSS 15.0 统计程序,单因素方差分析,以 Dunnett's t 检验分析样本均数间显著性差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

结果表明,人参皂苷 Rg3 能有效抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,且呈浓度和作用时间依赖性。药物作用 48 h 后,人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞增殖的 IC_{50} 值为 79.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果见表 1。

表 1 人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The inhibitory effect of ginsenoside Rg3 on MCF-7 cell proliferation($\bar{x} \pm s$)

组别/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
	OD 值(n=3)	抑制率/%	OD 值(n=3)	抑制率/%	OD 值(n=3)	抑制率/%
0	1.085±0.023	—	1.647±0.013	—	1.913±0.035	—
37.5	0.874±0.012	19.4	1.174±0.021	28.7	1.232±0.027	35.6
75	0.652±0.011	39.9	0.912±0.033	44.6	0.852±0.022	55.5
150	0.547±0.021	49.6	0.581±0.019	64.7	0.568±0.026	70.3
300	0.437±0.017	59.7	0.477±0.027	71.0	0.421±0.016	78.0
600	0.342±0.024	68.5	0.412±0.016	75.0	0.319±0.021	83.3

2.2 人参皂苷 Rg3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡和细胞周期分布的影响

为进一步分析药物对细胞凋亡的诱导作用以及对细胞周期分布的影响, 采用流式细胞仪检测的方法, 对 37.5, 75, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组药物处理 48 h 后的 MCF-7 细胞进行凋亡检测及细胞周期分布的分析。结果表明, 与空白对照组比较, 人参皂苷 Rg3 作用 48 h 后, G₀/G₁ 期、S 期细胞减少、而 G₂/M 期细胞比例显著增加($P<0.05$)。细胞的凋亡率亦显著增加, 且呈浓度依赖性($P<0.05$)。结果见图 1 和表 2。

表 2 人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞凋亡和细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 The effect of ginsenoside Rg3 on MCF-7 cell apoptosis and cell cycle distribution($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	细胞 凋亡率/%	细胞周期分布/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白对照组	2.3±0.3	53.2±11.7	33.9±6.8	12.9±3.3
37.5	25.2±2.6 ¹⁾	45.1±8.7 ¹⁾	29.1±5.3	25.8±4.3 ¹⁾
75	45.5±3.9 ²⁾	39.7±6.3 ¹⁾	25.6±4.5 ¹⁾	34.7±6.7 ²⁾
150	76.8±8.4 ³⁾	35.2±6.9 ²⁾	22.5±4.7 ¹⁾	42.3±9.3 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$
Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$

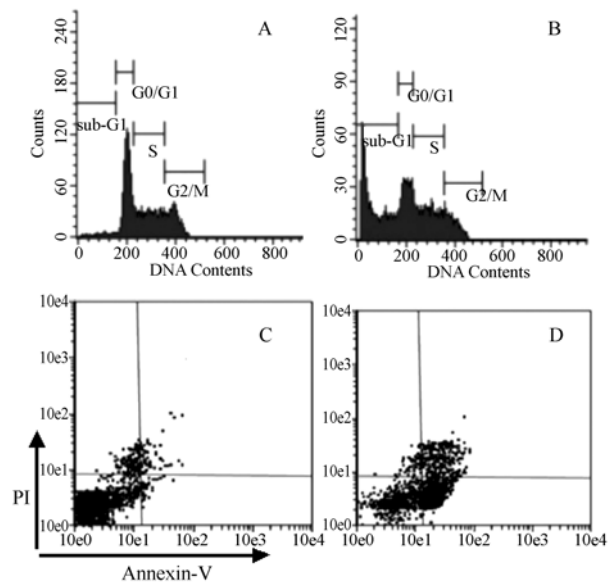


图 1 采用流式细胞仪分析人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞周期分布和细胞凋亡的影响

A, C-空白对照组; B, D-75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组

Fig 1 The influence of ginsenoside Rg3 on MCF-7 cell apoptosis and cell cycle distribution analyzed with flow cytometry

A, C-Blank control group; B, D-75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rg3 group

2.3 人参皂苷 Rg3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭能力及 MMP-9 基因表达水平的影响

结果表明, 与对照组比较, 37.5, 75, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的人参皂苷 Rg3 能显著抑制 MCF-7 细胞的侵袭指数($P<0.01$); 同时其还能显著抑制细胞中 MMP-9 mRNA 的表达水平, 且呈浓度依赖性($P<0.05$)。结果见表 3、图 2 和图 3。

表 3 人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞侵袭能力及 MMP-9 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 The effect of ginsenoside Rg3 on MCF-7 cell invasion and the expression of MMP-9 mRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	细胞侵袭指数/%	MMP-9 mRNA 相对表达量
空白对照组	81.5±5.4	0.467±0.014
37.5	47.8±3.2 ²⁾	0.408±0.016 ¹⁾
75	36.7±3.9 ²⁾	0.368±0.018 ¹⁾
150	29.6±1.7 ³⁾	0.314±0.011 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$
Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$

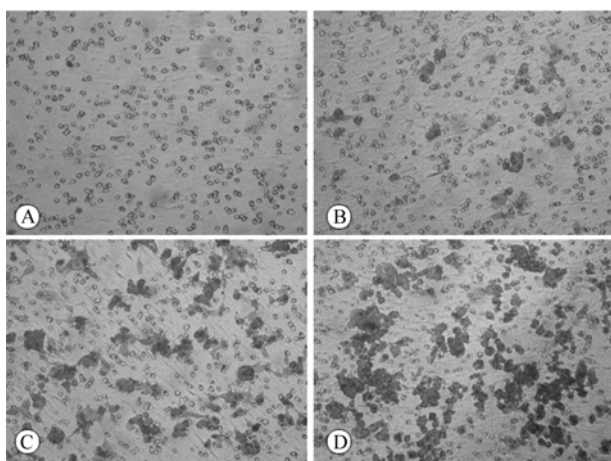


图2 采用 Transwell 分析人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响。

A-150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; B-75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; C-37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; D-空白对照组

Fig 2 The effect of ginsenoside Rg3 on MCF-7 cell invasion by using Transwell

A-150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; B-75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; C-37.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; D-blank control group

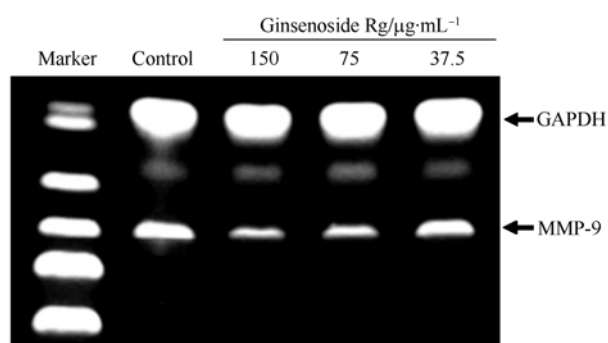


图3 人参皂苷 Rg3 对 MCF-7 细胞 MMP-9 mRNA 表达水平的影响

Fig 3 The effect of ginsenoside Rg3 on the expression of MMP-9 mRNA of MCF-7 cell

3 讨论

实验室及流行病学研究结果均表明, 乳腺癌致病危险因子与雌激素的暴露有关, 而全球工业化污染的加重导致人类体内雌激素的实际负荷量增加, 使乳腺癌发病率呈逐渐上升趋势, 严重危害广大妇女的身心健康。MCF-7 细胞是雌激素受体阳性的人乳腺癌细胞株, 能特异性地受雌激素或雌激素样活性物质调节而增殖^[3]。本研究则采用

MCF-7 作为研究对象, 分析评价了人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞增殖及侵袭能力的影响。人参皂苷 Rg3 是一种四环三萜皂苷, 其抗肿瘤作用已经引起广泛重视, 但是确切机制尚未明了。有研究证实^[4], 人参皂苷 Rg3 能够抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和转移, 其作用机制为抑制肿瘤新生血管的形成。而本研究结果表明, 人参皂苷 Rg3 能显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 并导致 G₀/G₁ 期及 S 期细胞比例减少, 而 G₂/M 期细胞比例显著增加, 细胞凋亡率亦显著提升; 同时 MCF-7 细胞的侵袭指数亦降低, 且呈现良好的浓度依赖性, 表明人参皂苷 Rg3 具有抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭的作用。

MMP-9 是 MMPs 中相对分子质量最大的酶, 以胶原的形式分泌, 被激活后形成 IV 型胶原酶, 可降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质中的 IV 型、V 型胶原和明胶^[5], 促进肿瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润, 最终导致肿瘤的侵袭和转移。本研究结果显示, 人参皂苷 Rg3 能有效抑制 MCF-7 细胞中 MMP-9 mRNA 的表达水平。提示人参皂苷 Rg3 具有抑制乳腺癌细胞增殖侵袭的作用, 其作用机制可能与降低细胞 MMP-9 基因的表达有关。但人参皂苷 Rg3 具体如何影响乳腺癌细胞内信号转导通路及其具体环节、靶点尚需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] EL-BAYOUMY K, SINHA R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compound [J]. *Mutat Res*, 2004, 551(12): 181-197.
- [2] COON J T, ERNST E. Panax ginseng: a systematic review of adverse effects and drug interactions [J]. *Drug Saf*, 2002, 25(5): 323-344.
- [3] GENNARI R, CURLGLIANO G, ROMENSZ N, et al. Breast carcinoma in elderly women: features of disease presentation, ehdee of local and systemic treatments com pared with younger post menopausal patients [J]. *Cancer*, 2004, 101(6): 1302-1310.
- [4] YANCOPOULOS G D, KLAGSBRUN M, FOLKMAN J. Vasculogenesis, angiogenesis and growth factors: ephrins enter the frag at the border [J]. *Cell*, 1998, 93(5): 661-664.
- [5] KOBAYASHI H. Suppression of urokinase expression and tumor metastasis by bikunin ovemxpression [J]. *Hum Cell*, 2001, 14(3): 233-236.

收稿日期: 2012-11-05