

人参皂苷 Rd 对 U251 神经胶质瘤细胞凋亡的影响^{*}

楚丽丽, 宛蕾^{**}

(贵州医科大学 基础医学院 药理教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究人参皂苷 Rd 对 U251 神经胶质瘤细胞凋亡的影响。方法: U251 细胞分空白对照组和低、中、高剂量人参皂苷 Rd 组, 分别与 U251 细胞作用 48 h 后, 采用 Hoechst33258 荧光染色观察细胞凋亡形态、流式细胞仪 Annexin-V FITC/PI 双染检测细胞凋亡率、PI 染色检测细胞周期、免疫组化法检测细胞周期蛋白 CyclinD1 的表达。结果: Hoechst33258 荧光染色表明各给药组均可见细胞凋亡的形态特征, Annexin-V FITC/PI 双染结果示人参皂苷 Rd 可诱导 U251 细胞凋亡, 且有剂量依赖性; PI 染色结果显示人参皂苷 Rd 阻滞细胞于 G₀/G₁ 期, 免疫组化结果显示人参皂苷 Rd 可下调 CyclinD1 蛋白表达。结论: Rd 可体外诱导 U251 细胞凋亡, 并抑制细胞周期进程, 其机制可能与下调 CyclinD1 蛋白表达有关。

[关键词] 中草药; 人参属; 细胞系, 肿瘤; 细胞周期; 细胞凋亡; 人参皂苷

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)02-0179-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.02.010

Effect of Ginsenoside Rd on the Apoptosis of Glioma U251 Cells

CHU Lili, WAN Lei

(Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of ginsenoside Rd on apoptosis of glioma U251 cells.

Methods: U251 cells were treated with blank (control group) or ginsenoside Rd (low, medium and high-dose groups). At 48 hr after the treatment, the cells were stained with Hoechst 33258 fluorescence to detect the morphology of apoptotic cells, stained with Annexin-V FITC/PI to detect apoptotic rates, and stained with PI to detect the cell cycle. Immunohistochemistry was used to detect the expression of CyclinD1. **Results:** Hoechst 33258 fluorescence staining showed that the morphological characteristics of apoptotic cells were visible in each ginsenoside Rd group. Annexin-V FITC/PI staining analysis showed that ginsenoside Rd induced the apoptosis in a dose-dependent manner. PI staining revealed that ginsenoside Rd blocks cells at the G₀/G₁ phase. Immunohistochemistry analysis showed that ginsenoside Rd downregulated CyclinD1 protein expression. **Conclusion:** Ginsenoside Rd induced apoptosis of U251 cells and inhibited cell cycle progression. The mechanism may be related to the downregulation of CyclinD1 protein expression.

[Key words] drugs, Chinese herbal; panax; cell line, tumor; cell; apoptosis; ginsenoside

人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd, GS-Rd) 是从中药人参中分离的单体成分, 属于稀有皂苷, 在三七中约含 0.36% ~ 1.47%^[1], 可由人参皂苷 Rb-1 经肠道酶代谢获得, 是皂苷经肠道吸收利用的形式之

一。人参皂苷 Rd 具有抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡和分化、抑制其生长和转移的作用; 还可抗疲劳、调节中枢神经系统、改善心脑血管、提高机体免疫力^[2-7]。此外, 还有提高学习能力、抗衰老^[8-9]、抗

^{*} [基金项目] 贵州省科学技术基金项目 [黔科合 J 字 (2005) 2070]

^{**} 通信作者 E-mail: 1325164635@qq.com

溃疡性结肠炎^[10]、抗肝纤维化^[11]和抗炎镇痛^[12-14]等作用。神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,发病率约占脑肿瘤的 46%^[15],5 年生存率不超过 5%^[16],预后差易复发^[17]。目前此病的发病机制尚不完全清除,其发生发展过程受多因素多步骤影响^[18]。传统治疗方法以手术及术后放化疗为主,但此肿瘤呈侵袭性生长,完全清除难度高,且目前使用的放化疗药物对机体正常组织造成伤害的同时易产生耐药性^[19]。人参皂苷 Rd 属脂溶性小分子物质,生物活性较强,对正常细胞无毒,在诱导大肠癌、肺癌、乳腺癌和黑色素瘤等细胞凋亡方面的研究已有报道,但对治疗胶质细胞瘤方面尚未见报道。因此本研究通过观察人参皂苷 Rd 对神经胶质瘤 U251 细胞凋亡的影响并探讨可能的机制,为其在神经胶质瘤治疗中的应用提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验药物:人参皂苷 Rd(纯度 90% 以上),贵州信邦制药股份有限公司。细胞株:U251 细胞系购于中国科学院上海细胞库。试剂:MTT(四甲基偶氮唑蓝)购自北京鼎国生物技术有限责任公司,1,2-丙二醇(批号 930309),购自重庆东方试剂厂,Hoechst33258(碧云天生物技术研究),兔抗 CyclinD1 单克隆抗体(批号 13670111)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。仪器:荧光倒置显微镜(OLYMPUS IX71,日本),流式细胞仪 FACS-Calibur(美国 BD)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 U251 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 换液 1 次。

1.2.2 Hoechst 33258 荧光染色法检测细胞凋亡 实验分空白对照组和低(20 μmol/L)、中(40 μmol/L)、高(80 μmol/L)剂量人参皂苷 Rd 组。将即用型细胞爬片放入 6 孔板中,U251 细胞以 2 × 10⁷/L 密度均匀接种于玻片上培养,低、中、高剂量人参皂苷 Rd 干预 48 h,经 Hoechst33258 染色后在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.3 流式细胞术 Annexin-V FITC/PI 双染检测细胞凋亡率 U251 细胞给药处理 48 h 后收集,冷 PBS 液洗涤后离心弃上清,加入 Binding Buffer 继续离心弃上清,样本管加 AnnexV-FITC 2.5 μL、PI

2.5 μL,并加入细胞悬液 100 μL,室温避光孵育 15 min。空白对照管只加入细胞悬液 100 μL,使用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)收集细胞 30 000 个,Cellquest 软件分析检测细胞凋亡率。

1.2.4 流式细胞术 PI 染色检测细胞周期 接种细胞 2 × 10⁹/L,17 h 后细胞贴壁生长后给予不含血清的高糖 DMEM 溶液培养 24 h,给予低、中、高剂量人参皂苷 Rd 处理 48 h。收集细胞密度达到 1 × 10⁹/L,加入 PBS 1.0 mL 混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;冷 PBS 液洗涤 2 次,再以 2 000 r/min,室温离心 5 min。弃上清后加入含 RNase A 的 PI 染液 1 mL,37 ℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 CyclinD1 蛋白表达

采用 PV 二步免疫组化法染色:消化细胞并计数,将细胞以 2 × 10⁷/L 密度接种于预先放置细胞爬片的 6 孔板中,置 37 ℃ 培养箱中孵育,各组给予相应处理后取出细胞爬片自然干燥,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次;用 0.3% TritonX-100 PBS 液通透细胞膜 10 min、0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次;3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶,0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次;分别滴加兔抗人 CyclinD1 抗体,置于湿盒内 4 ℃ 过夜;次日取出湿盒室温下复温 60 min,0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 3 次;滴加二抗,37 ℃ 孵育 30 min、0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次;滴加新鲜配置的 DAB 显色 7 min,自来水充分冲洗终止染色;之后浸入苏木素染色液复染 20 s,自来水冲洗终止复染;梯度酒精脱水(70%、80%、90%、95%、100%),二甲苯溶液透明 5 min × 2 次,中性树胶封片,倒置显微镜下观察拍片并对结果进行统计学分析。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,组间比较用单因素方差分析进行统计学处理,两两比较采用 *t* 检验;*P* < 0.05 和 *P* < 0.01 认为差异有统计学意义。

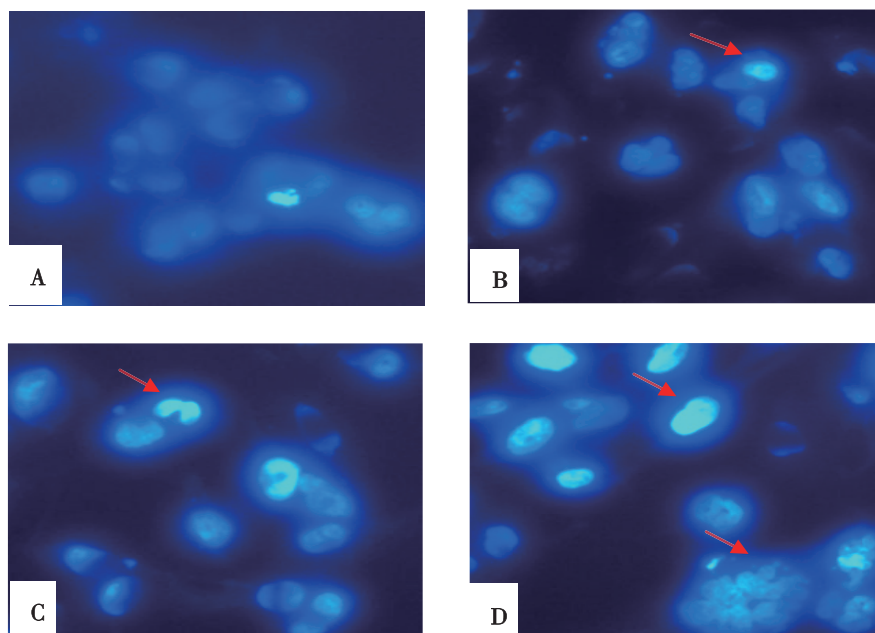
2 结果

2.1 Hoechst33258 荧光染色检测人参皂苷 Rd 对 U251 神经胶质瘤细胞凋亡的影响

Hoechst33258 染色结果显示,空白对照组有少量 U251 细胞细胞核呈致密的强荧光团影并出现

细胞核碎块,即出现少量凋亡细胞;人参皂苷 Rd 低、中、高剂量组细胞荧光强度增强且随着浓度的增

加,细胞的上述改变越明显,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1、图 2。



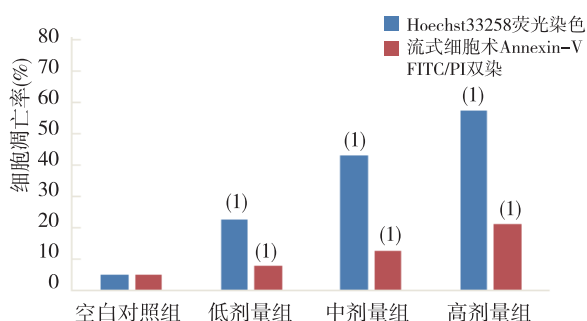
注:A 为空白对照组,B 为低剂量组,C 为中剂量组,D 为高剂量组,箭头所示为细胞凋亡小体。

图 1 Hoechst33258 荧光染色检测人参皂苷 Rd 对 U251 细胞凋亡的影响(200 ×)

Fig. 1 The effect of ginsenoside Rd on U251 cell apoptosis by Hoechst33258 fluorescence staining(200 ×)

2.2 流式细胞术 Annexin-V FITC/PI 双染检测人参皂苷 Rd 对 U251 神经胶质瘤细胞凋亡率的影响

人参皂苷 Rd 处理之后 U251 细胞的损伤中以早期凋亡细胞为主,低、中、高剂量组随着药物浓度的增加细胞早期凋亡率也随之增加,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.1$)。见图 2。



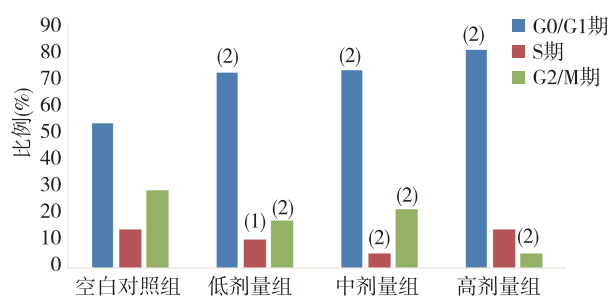
注:⁽¹⁾与空白对照组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 Hoechst33258 荧光染色、流式细胞术 Annexin-V FITC/PI 双染检测人参皂苷 Rd 对 U251 细胞凋亡率的影响

Fig. 2 The effect of ginsenoside Rd on apoptotic rates by Hoechst33258 fluorescence staining and Annexin-V FITC/PI staining

2.3 人参皂苷 Rd 对 U251 细胞周期的影响

低、中、高剂量组 U251 细胞 G_0/G_1 期比例随药物浓度增加逐渐增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与空白对照组比较,低、中剂量组 S 期所占比例降低,低、中、高剂量组 G_2/M 期所占比例降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。



注:与空白对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 3 人参皂苷 Rd 对 U251 细胞周期的影响

Fig. 3 The effect of ginsenoside Rd on U251 cell cycle

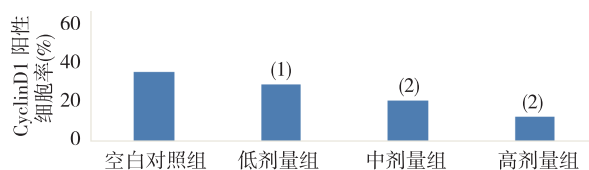
2.4 人参皂苷 Rd 对 U251 神经胶质瘤细胞 CyclinD1 蛋白表达的影响

低、中、高剂量组作用于 U251 细胞后,倒置显微镜下观察 CyclinD1 阳性表达部位在细胞核,免疫组化方法染色呈棕黄色。结果显示,空白对照组

中 CyclinD1 蛋白表达颜色深,且细胞表达数目多;而人参皂苷 Rd 低、中、高剂量组,CyclinD1 蛋白表达颜色变浅,与空白对照组相比,低剂量组、中、高剂量组且细胞表达数目均减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4、图 5。

3 讨论

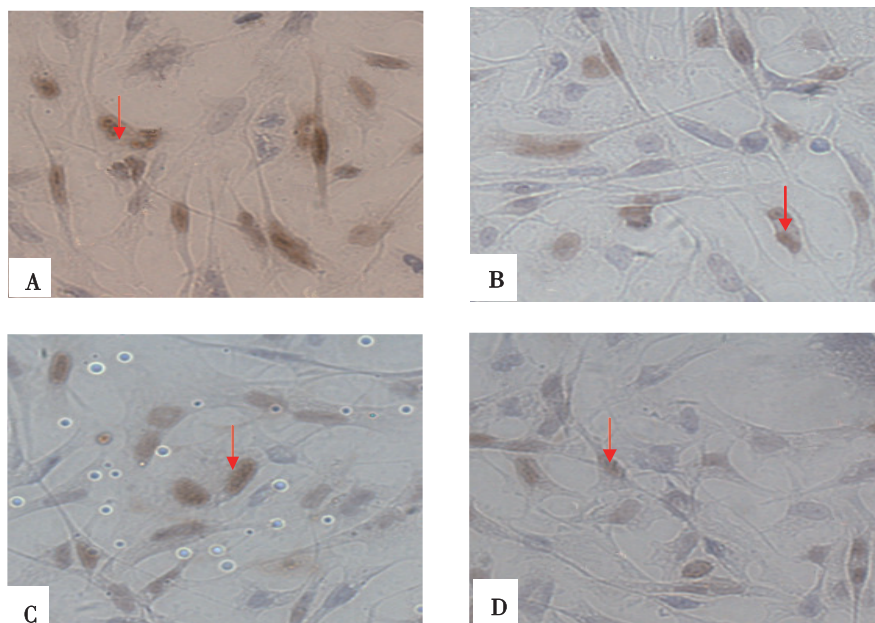
目前研究表明,肿瘤发生和细胞周期进程有密切联系^[20-21],也就是说肿瘤是一类细胞周期性疾



注:与空白对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

图 4 人参皂苷 Rd 对 U251 细胞 CyclinD1 蛋白表达的影响

Fig.4 The effect of ginsenoside Rd on the expression of CyclinD1egg white in U251 cells



注:A 为空白对照组,B 为低剂量组,C 为中剂量组,D 为高剂量组,箭头所示为 CyclinD1 阳性表达。

图 5 人参皂苷 Rd 对 U251 细胞 CyclinD1 蛋白表达的影响(PV, $\times 200$)

Fig.5 The effect of ginsenoside Rd on CyclinD1 expression(PV, $\times 200$)

病。细胞周期蛋白在细胞周期进程中 G_1 -S、 G_2 -M 转换的两个关卡进行调控,其中 G_1 期是决定细胞周期长短的限速期,细胞一旦跨过此点,反复进入细胞周期,直接导致细胞恶性增殖,这是发生肿瘤的根本原因。CyclinD1 参与细胞周期 G_1 到 S 期的转换^[22],起着重要的正性调控作用,在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用。CyclinD1 最早出现于 G_1 期早期,正常情况下呈一过性表达;但是过度表达时可与 CDK4/CDK6 形成蛋白复合物,激活 CDK4 和 CDK6 的活性,蛋白激酶磷酸化失活,使细胞增殖对有丝分裂原的依赖性降低,周期调节失控 G_1 期缩短、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡^[23],最终发生癌变^[24-25]。由此可见,CyclinD1

表达减少能有效抑制 CyclinD-CDK4/CDK6 复合物生成,从而不能越过 G_1 期限制点,将细胞阻滞在 G_0/G_1 期,不能由静止状态进入细胞周期,影响细胞增殖。本研究显示,通过常用的血清饥饿法诱导 U251 细胞停留在 G_0 期,给予 Rd 作用之后,随着药物浓度的增加, G_0/G_1 期所占细胞周期的比例逐渐增加,S 期也一定的下降趋势,同时 CyclinD1 表达率也逐渐下降。与上述通过 CyclinD1 表达减少,使其不能越过 G_1 限定,并将细胞阻滞于 G_0/G_1 期,使细胞周期发生紊乱相吻合。

综上所述,人参皂苷 Rd 可以有效的抑制神经胶质瘤 U251 细胞的增值,并将细胞阻滞在 G_0/G_1 期,其作用可能是通过下调 CyclinD1 的表达有关,

但具体的分子机制需要进一步完善。本实验研究为开发人参皂苷 Rd 成为新的治疗神经胶质瘤的候选药物提供了基本的实验依据。

4 参考文献

- [1] 刘德育,曾飒.从三期药材中快速批量分离提取人参皂苷 Rd 的方法[J].中药材,2006,29(3):247-249.
- [2] YE R D,LI N L,HAN J L,et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rd against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons [J]. Neurosience Research, 2009,64(10):306-310.
- [3] YANG L,DENG Y H,XU S J,et al. In vivo pharmacokinetic and metabolism studies of ginsenoside Rd[J]. Journal of Chromatography B, 2007,854:77-84.
- [4] YE R D,HAN J L,KONG X W,et al. Protective effects of ginsenoside Rd on PC12 cells against Hydrogen Peroxide [J]. Biol. Pharm. Bull, 2008,31(10):1923-1927.
- [5] LI X Y,LIANG J,TANG Y B,et al. Ginsenoside Rd prevents glutamate-induced apoptosis in rat cortical neurons [J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2010,37:(2)199-204.
- [6] LIU X,WANG L,WEN A,et al. Ginsenoside-Rd improves outcome of acute ischaemic stroke-a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial [J]. European Journal of Neurology, 2012,19(6):855-863.
- [7] GUAN Y Y,ZHOU J G,ZHANG Z,et al. Ginsenoside-Rd from panax notoginseng blocks Ca^{2+} influx through receptor-and store-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2006,548(3):129-136.
- [8] ZHANG X,SHI M,YE R,et al. Ginsenoside Rd attenuates tau protein phosphorylation via the PI3K/AKT/GSK-3 β pathway after transient forebrain ischemia [J]. Neurochemical Research, 2014,39(7):1363-1373.
- [9] LIU J,YAN X,LING L,et al. Ginsenoside Rd improves learning and memory ability in APP transgenic mice[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2015,57(4):522-528.
- [10] YANG X L,GUO T K,WANG Y H,et al. Therapeutic effect of ginsenoside Rd in rats with TNBS. induced recurrent ulcerative colitis [J]. Archives of Pharmacai Research, 2012,35(7):1231-1239.
- [11] 李小勇,刘雅.人参皂苷 Rd 抑制肝星状细胞活化作用与机制研究[J].中国药理学与临床,2017,33(2):34-37.
- [12] CHOI S S,LEE J K,SUH H W. Effect of ginsenosides administered intrathecally on the antinociception induced by cold water swimming stress in the mouse[J]. Biol Pharm Bull, 2003,26(6):858-861.
- [13] 屠令锋,曹荣,段丽,等.人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠痛觉异常及脊髓背角内谷氨酸和 NR2A/B 表达的影响[J].神经解剖学杂志,2011,27(2):129-134.
- [14] 曹荣,屠令峰,段丽,等.人参皂甙 Rd 对 SNI 大鼠痛觉异常脊髓背角内 P 物质和 NK-1 受体表达的影响[J].神经解剖学杂志,2011,27(1):8-13.
- [15] OSTROM Q T,GITTLEMAN H,FARAH P,et al. Cbtrus statistical report;pri-mary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010 [J]. Neuro Oncol, 2013,15(SUP 2):ii1-ii56.
- [16] MALMSTROM A,GRONBERG B H,MAROSI C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomized, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2012,13(9):916-926.
- [17] MIN W J,LI,ZHANG Y H,et al. Role of the anti-glioma drug ATI3148 in the inhibition of Notch signaling pathway [J]. Gene, 2015,573(1):153-159.
- [18] COHEN A L,COLMAN H. Glioma biology and molecular markers [J]. Cancer Treat Res, 2015,163(5):15-30.
- [19] SZE C I,SU W P,CHIANG M F,et al. Assessing current therapeutic approaches to decode potential resistance mechanisms in glioblastomas [J]. Front Oncol, 2013,3(3):59.
- [20] 马福超. survivin 与肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2010,2(3):239-241.
- [21] 叶星星,蔡志毅,刘池波. 细胞周期蛋白 G1/G2 与恶性肿瘤的研究进展[J]. 温州医学院院报, 2011,41(3):299-301.
- [22] LI T,SONG T,NI I,et al. The p-ERK-p-c-Jun-cyclinD1 pathway ie involved in proliferation of smooth muscle cells after exposure to cigarette smoke extract [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,453(3):316-320.
- [23] XIAO B,SPENCER J,CLEMENTS A,et al. Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(5):2363-2368.
- [24] ALAO J P. The regulation of Cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention[J]. Mol Cancer, 2007,6(4):24-28.
- [25] KIM J K,DIEHL J A. Nuclear CyclinD1: An oncogenic driver in human cancer[J]. Cell Physiol, 2009,220(2):292-299.

(2019-11-06 收稿,2020-01-12 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 张启芳