

# 人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞增殖的影响及其机制探讨

潘晓华<sup>1</sup>, 王墨林<sup>2\*</sup>, 崔 行<sup>2</sup>

(1 山东省立医院, 济南 250021; 2 山东大学医学院)

**摘要:**目的 观察人参皂苷 Rg3 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响, 并探讨其机制。方法 取处于对数生长期的 MDA-MB-231, 加入不同终浓度(50、100、200、400、600  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rg3, 以不加入人参皂苷 Rg3 为对照。MTT 法检测细胞生长情况; Western blot 法检测细胞中细胞周期蛋白 E(Cyclin E) 及细胞分裂周期蛋白 25A(CDC25A) 表达水平。结果 低浓度( $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ ) 的人参皂苷 Rg3 可促进 MDA-MB-231 增殖, 高浓度( $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ ) 的人参皂苷 Rg3 则抑制其增殖。与对照细胞比较, 低浓度人参皂苷 Rg3 处理的细胞中 Cyclin E 及 CDC25A 的表达增高, 高浓度处理者 Cyclin E 及 CDC25A 的表达下降( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 高浓度人参皂苷 Rg3 在体外对乳腺癌细胞的生长具有抑制作用, 其机制可能与抑制细胞周期关键蛋白 Cyclin E 及 CDC25A 的表达有关。

**关键词:** 人参皂苷 Rg3; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期蛋白 E; 细胞分裂周期蛋白 25A

**中图分类号:** R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-266X(2011)26-0020-03

## Research on the effect of ginsenoside Rg3 on proliferation of breast cancer cell line

PAN Xiao-hua<sup>1</sup>, WANG Mo-lin, CUI Xing

(1 Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, P. R. China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rg3 on cell proliferation of breast cancer cell line MDA-MB-231 and the possible mechanism involved. **Methods** MDA-MB-231 cells at logarithmic growth phase were obtained, and were cultured with ginsenoside Rg3 of different concentrations (50, 100, 200, 400, 600  $\mu\text{mol/L}$ ). Cells cultured without ginsenoside Rg3 were served as controls. The proliferation of cells were detected by MTT assay, and the expression of Cyclin E and CDC25A was examined by Western blot, respectively. **Results** The growth rates on MDA-MB-231 cells treated with ginsenoside Rg3 of low concentration ( $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ ) increased, but those treated with ginsenoside Rg3 of high concentration ( $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ ) grew more slowly, compared with control group. The expression of cellular Cyclin E and CDC25A rose when exposed to ginsenoside Rg3 of low concentration ( $\leq 200 \mu\text{mol/L}$ ) while declined when exposed to ginsenoside Rg3 of high concentration ( $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ ). **Conclusions** Ginsenoside Rg3 of high concentration ( $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ ) can inhibit the growth of MDA-MB-231. This effect may involve its suppression of cell-cycle related protein Cyclin E and CDC25A.

**Key words:** ginsenoside Rg3; breast neoplasms; cell proliferation; Cyclin E; cell division cycle 25A protein

目前对乳腺癌的治疗主要采用手术、化放疗等综合治疗。传统化疗药物多存在选择性差、毒性作用大、易发生耐药等问题。研究开发新的化疗辅助药物对于提高疗效, 减轻患者痛苦具有重要意义。人参作为我国传统的名贵中药材, 具有多种生物活性。已证实多种人参皂苷单体如 Rh、Rg 等均具有抗肿瘤作用, 但其确切机制尚未明了。2010 年 1 月~2011 年 1 月, 我们观察了人参皂苷 Rg3 对雌激素

受体(ER)阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 增殖的影响。现报告如下并探讨其可能机制。

### 1 材料与方法

1.1 主要试剂 人参皂苷 Rg3(中国药品生物制品检定所), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Santa Cruz, USA), 辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司), DMEM 培养基(GIBCO, USA), 胎牛血清(杭州四季青生物工程公司)。超敏化学发光(ECL)试剂盒(Amersham Biosciences, USA)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白质定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.2 人参皂苷 Rg3 溶液制备及细胞培养 人参皂

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30500190); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(2008BS03024); 山东省科技发展计划项目(2009GG10002012)。

\* 通讯作者

苷 Rg3 干粉用二甲亚砜(DMSO)溶解为 100 mg/ml, 备用;MDA-MB-231 购自上海细胞所, 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 的 DMEM 培养基中,37 °C 恒温培养,生长至 80% ~90% 融合后传代,隔天换液 1 次。

1.3 细胞分组及细胞活力检测 取对数生长期的 MDA-MB-231, 按 2 000/孔的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h 后加药。每组设 4 个复孔, 分别加入终浓度为 50、100、200、400、600 μmol/L 人参皂苷 Rg3 (为实验组), 设不加药物的细胞为对照组。采用 MTT 法测算两组细胞存活率。两组分别于孵育 24、48、72 h 后每孔加 MTT(5 g/L) 20 μl, 继续孵育 4 h 后弃培养液, 加入 DMSO 150 μl/孔混匀, 酶标仪(波长 570 nm)测定各孔 OD 值。细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

1.4 细胞中 Cyclin E 及 CDC25A 检测 收集两组细胞, 提取总蛋白, 二喹啉甲酸法测定蛋白浓度, 按试剂盒说明书操作。取蛋白样品 40 μg, 适量上样缓冲液混匀, 100 °C 变性 5 min, 用 5% 积层胶、10% 分离胶的 SDS-PAGE 电泳后, 采用 Western blot 法检测细胞内 Cyclin E、CDC25A。用凝胶图像分析系统对 Western blot 反应阳性条带进行积分光密度( IOD)测定, 以 Cyclin E、CDC25A IOD 值与对应的 GAPDH IOD 值的比值代表其相对表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 *t* 检验。P ≤ 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg3 对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响 50 ~ 200 μmol/L 的人参皂苷 Rg3, 具有促进 MDA-MB-231 增殖作用, 促增殖能力与药物浓度成正比(P 均 < 0.01); 400 ~ 600 μmol/L 的人参皂苷 Rg3 则抑制细胞增殖, 其抑制能力与药物浓度成正比(P 均 < 0.01)。详见表 1。

表 1 实验组中不同浓度人参皂苷 Rg 对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

人参皂苷 Rg3 浓度(μmol/L)	MDA-MB-231 细胞存活率		
	24 h	48 h	72 h
50	108.65 ± 0.92	122.71 ± 1.35	141.43 ± 1.06
100	115.81 ± 1.68	127.45 ± 0.71	148.68 ± 1.55
200	109.52 ± 1.43	123.53 ± 1.02	133.68 ± 1.84
400	68.13 ± 1.76	73.37 ± 0.96	80.36 ± 1.53
600	57.91 ± 2.01	65.25 ± 1.78	66.96 ± 2.19

2.2 两组细胞中 Cyclin E、CDC25A 表达水平比较 50 ~ 200 μmol/L 的人参皂苷 Rg3, 上调 MDA-MB-231 内 Cyclin E、CDC25A 表达, 并与其药物浓度呈正比(P 均 < 0.01); 400 ~ 600 μmol/L 的人参皂苷 Rg3 则抑制 Cyclin E、CDC25A 表达, 其抑制能力与

药物浓度成正比(P 均 < 0.01)。详见表 2。

表 2 两组 MDA-MB-231 内 Cyclin E、CDC25A 相对表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Cyclin E	CDC25A
对照组	1.035 ± 0.032	0.511 ± 0.017
实验组		
50 μmol/L	1.078 ± 0.049	0.586 ± 0.009
100 μmol/L	1.101 ± 0.016	0.595 ± 0.014
200 μmol/L	1.113 ± 0.027	0.597 ± 0.011
400 μmol/L	0.644 ± 0.037	0.384 ± 0.007
600 μmol/L	0.482 ± 0.039	0.353 ± 0.013

3 讨论

已有研究证实, 人参皂苷类药物可以抑制肿瘤细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 对化疗药效有增强作用<sup>[1]</sup>; 动物实验也发现人参皂苷可以抑制小鼠体内卵巢癌的生长和癌细胞增殖<sup>[2]</sup>。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。

本研究结果显示, 低浓度(≤200 μmol/L) 人参皂苷 Rg3, 对 MDA-MB-231 增殖具有促进作用, 其促增殖能力与药物浓度成正比(P 均 < 0.01); 高浓度(≥400 μmol/L) 人参皂苷 Rg3 则抑制细胞增殖, 其抑制能力与药物浓度成正比(P 均 < 0.01)。对细胞周期相关蛋白的检测发现, 与对照细胞比较, 低浓度人参皂苷 Rg3 可上调 MDA-MB-231 内 Cyclin E、CDC25A 表达, 高浓度人参皂苷 Rg3 则抑制 Cyclin E、CDC25A 表达。人参皂苷 Rg3 对 MDA-MB-231 细胞内 Cyclin E、CDC25 表达水平的影响与其对细胞存活率的影响趋势一致, 提示 Rg3 可能通过调节细胞周期影响肿瘤细胞的增殖。

Cyclin E 主要在细胞 G<sub>1</sub> ~ S 期表达, 通过结合并激活细胞周期蛋白依赖性激酶 2(CDK)2, 形成 Cyclin E-CDK2 复合物, 调节细胞 G<sub>1</sub>、S 期的过渡。Cyclin E 过量表达可持续性激活 CDK2, 进而促进视网膜神经胶质瘤蛋白磷酸化, 细胞发生异常增殖<sup>[3]</sup>。目前已经在多种类型肿瘤中发现了 Cyclin E-CDK2 的表达异常和功能失调, 表现为 Cyclin E 的表达与细胞周期不同步, 且表达水平显著高于生理水平<sup>[4-6]</sup>。通过药物抑制 Cyclin E 的表达, 可以造成细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞, 抑制肿瘤细胞增殖。

CDC25A 是双重特异性磷酸酶家族的重要成员, 主要在 G<sub>1</sub> 中晚期表达, 通过催化 CDK 去磷酸化促使细胞发生 G<sub>1</sub>、S 转换并进入 S 期<sup>[7]</sup>。CDC25A 参与 G<sub>2</sub>、M 期转换, 是重要的细胞周期调控因素之一<sup>[8]</sup>。CDC25A 在结肠癌、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤均呈过度表达, 通过抑制 CDC25A 的表达抑制肿瘤进展是乳腺癌治疗的一个新方向<sup>[9]</sup>。

综上所述, 高浓度人参皂苷 Rg3 对人乳腺癌

MDA-MB-231 的增殖具有抑制作用,此作用与影响细胞周期相关蛋白 Cyclin E、CDC25 的表达,导致细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 或 G<sub>2</sub> 期有关。人参皂苷 Rg3 的抑瘤作用研究还需利用动物模型进行体内实验,其影响细胞周期调控的相关信号通路尚需进一步深入研究。

**参考文献:**

[1] Jia WW, Bu X, Philips D, et al. Rh2, a compound extracted from ginseng, hypersensitizes multidrug-resistant tumor cells to chemotherapy[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2004,82(7):437.  
 [2] Nakata H, Kikuchi Y, Tode T, et al. Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998,89(7):733-740.  
 [3] Dapas B, Farra R, Grassi M, et al. Role of E2F1-Cyclin E1-cyclin E2 circuit in human coronary smooth muscle cell proliferation and therapeutic potential of its downregulation by siRNAs[J]. *Mol Med*, 2009,15(9-10):297-306.

[4] Yasui W, Oue N, Aung PP, et al. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review[J]. *Gastric Cancer*, 2005,8(2):86-94.  
 [5] Spruck C, Sun D, Fiegl H, et al. Detection of low molecular weight derivatives of cyclin E1 is a function of cyclin E1 protein levels in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006,66(14):7355-7360.  
 [6] Akli S, Keyomarsi K. Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2003,2(4 Suppl 1):38-47.  
 [7] Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation [J]. *EMBO Rep*, 2003, 4 (7): 671-677.  
 [8] Lehmann GM, McCabe MJ Jr. Arsenite slows S phase progression via inhibition of CDC25A dual specificity phosphatase gene transcription[J]. *Toxicol Sci*, 2007,99(1):70-78.  
 [9] Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2009,16(15):1831-1849.

(收稿日期:2011-03-29)

· 经验交流 ·

改良单孔钻颅引流术治疗慢性硬膜下血肿 30 例

王建会

(宁晋县医院,河北宁晋 055550)

慢性硬膜下血肿是临床常见病,钻颅引流术为治疗该病的首选方法。但术后易发生硬膜下积液、积气<sup>[1,2]</sup>。2008 年 1 月~2011 年 1 月,笔者采用改良钻颅引流术治疗慢性硬膜下血肿 30 例,疗效满意。现报告如下。

临床资料:本组男 21 例,女 9 例;年龄 55~78 岁。均有轻度头部外伤史。头痛 25 例,轻瘫 23 例,进行性智能障碍 10 例,语言障碍 11 例。所有患者均经 CT 扫描确诊,均为幕上血肿,其中额部 2 例,额颞部 5 例,额颞顶部 23 例;左侧 21 例,右侧 9 例。血肿量为 60~180 ml。

治疗方法:均行改良单孔钻颅引流术。颅骨钻孔进入后,“十”形切开硬脑膜外层(而非传统的全层切开),钝性分离内外层,电灼出血点。制备引流管:将其前端剪成斜形,稍后剪两个侧孔,置管时使侧孔位于颅骨与脑组织的两侧,管的远端接好无菌袋。于硬脑膜内层切开一小口,迅速用手指压住,防止积血外溢。迅速将引流管,沿该切口送入血肿腔,以不超过血肿腔的 1/2 为宜。见有陈旧血流出,予以缓慢引流,使颅内压逐渐下降,避免引流过快出现远隔部位血肿。依次缝合头皮各层,引流管从原切口引出、固定。术后去枕平卧,下肢抬高 20°~30°。补液 2 000~2 500 ml/d,以生理盐水为主,增加血流量及颅内静脉压,促使脑组织膨胀,减少血肿残腔。术后 2 d 复查头颅 CT,2~3 d 拔除引流管。

结果:30 例术后病情均有明显改善,以肢体肌力恢复最明显。术后无颅内积气发生。随访 6 个月,CT 复查无血肿复发。

讨论:慢性硬膜下血肿多发生于老年患者。因老年人脑

萎缩,蛛网膜下腔扩大,头部外伤时,脑在颅腔内的活动度加大,致脑表面桥静脉撕裂,缓慢出血而致慢性硬膜下血肿。首选方法是钻孔引流术<sup>[3]</sup>。因单孔钻颅创伤小,手术时间短,本组均采用单孔钻颅引流术。该手术的传统方法为“十”形切开硬脑膜,见有陈旧血流出后置引流管。

慢性硬膜下血肿颅内压多较高,血肿大量涌出影响置管,且由于脑组织搏动,使血肿腔内压力不稳定,血肿量减少后必然有空气入腔,术后易出现气颅。硬脑膜有两层,中间为一层薄的网状组织,血管和神经走行在此层<sup>[4]</sup>。笔者在手术时先切开患者硬脑膜的外层,分离内外层,置引流管前在硬脑膜内层先切一小口,立即用手指压住,防止积血外溢,随后将引流管自该切口送入血肿腔内。引流管周围不会留有缝隙,防止了空气进入,避免了术后颅内积气的发生。术中注意置管前应悬吊硬脑膜,以防硬脑膜剥离,引流血肿后颅内压降低,导致硬膜外血肿的发生;引流管远端预先接好引流袋,既能防止空气进入颅内,又易计算血肿量。

**参考文献:**

[1] 于烽,王伟明,赵保.慢性硬膜下血肿钻孔引流术后并发气颅的防治[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*,2004,3(1): 89.  
 [2] 刘猛,刘玉光,苏万东,等.张力性气颅诊治分析[J]. *中华外科杂志*,2004,42(14):890.  
 [3] 王忠诚.王忠诚神经外科学[M].武汉:湖北科学技术出版社,2005:448-450.  
 [4] 段国升,朱诚.神经外科手术学[M].2版.北京:人民军医出版社,2007:38.

(收稿日期:2011-05-05)