

文章编号:1007-4287(2016)12-1982-04

人参皂苷 Rg5 对人食管癌细胞作用的研究

梅志宏¹, 丁雅明¹, 李 凡², 付学奇³, 刘林林^{1*}, 朱洪权^{1*}

(1. 吉林大学第二医院, 吉林 长春 130041; 2. 吉林大学基础医学院; 3. 吉林大学生命科学院)

摘要:目的 探索人参皂苷 Rg5 对人食管癌细胞 Eca-109 的作用及机制。方法 利用不同浓度人参皂苷 Rg5 在体外对人食管癌 Eca109 细胞作用不同时间, 采用 CCK-8 法检测细胞抑制率, Annexin V-FITC/PI 双染色后流式细胞仪检测细胞凋亡率, PI 单染法检测细胞周期。结果 在浓度分别为 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rg5 作用人食管癌细胞 24 h 后出现明显形态学变化, 同时处于 S 期及 G2/M 期细胞较对照组明显增多, 分别为 53.08%、25.84% 和 58.44%、31.48%, 流式细胞仪检测早期凋亡率分别为 11.45%、30.13%。结论 人参皂苷 Rg5 能抑制食管癌 Eca-109 细胞增殖, 其机制可能为增加细胞早期凋亡, 引起细胞周期滞留。

关键词: 人参皂苷 Rg5; 食管癌细胞 Eca109; 细胞周期; 凋亡**中图分类号:** R735.1**文献标识码:** A

Effect of ginsenoside Rg5 on human esophageal cancer cells MEI Zhi-hong, DING Ya-ming, LI Fan, et al. (The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of ginsenoside Rg5 on human esophageal cancer cell line Eca-109. **Methods** The inhibitory rate of human esophageal cancer cell line Eca109 in vitro was measured by CCK-8 method. The apoptosis rate of cells was detected by flow cytometry after Annexin V-FITC / PI double staining. Cell cycle. **Results** After treated with ginsenoside Rg5 at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h, the morphological changes were observed, and the cells in S phase and G2/M phase were significantly higher than those in the control group (53.08%, 25.84% and 58.44%, 31.48% respectively ($P < 0.05$). The early apoptotic rates were 11.45% and 30.13% respectively by flow cytometry ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg5 can inhibit the proliferation of esophageal cancer Eca-109 cells, and its mechanism may be to increase the early apoptosis of cells, causing cell cycle arrest.

Key words: ginsenoside Rg5; esophageal cancer cell Eca 109; cell cycle; apoptosis

(Chin J Lab Diagn, 2016, 20:1982)

食管癌是常见的消化道肿瘤, 2008 年其全世界平均发病率居所有恶性肿瘤第 9 位; 死亡率居第 8 位, 而中国大陆食管癌发病率居全国各类恶性肿瘤第 5 位, 死亡率高居第 4 位, 显著高于国际平均水平^[1]。居高不下的发病率及死亡率严重威胁人类的健康。目前食管癌的治疗手段主要是手术及放化疗治疗。因其解剖位置特殊, 治疗效果一般, 预后较差, 应用新型药物延缓其复发和转移是提高其治疗疗效的手段之一。

人参皂苷 Rg5 是从人参中提取的稀有人参皂苷, Rg5 能诱导多种肿瘤细胞凋亡, Shin-jung Kim^[2] 等人从细黑参中提取的 Rg5 已验证在人乳腺癌细胞 (MCF-7、MDA-MB-453)、Li-dan Liang^[3] 等报道 Rg5 能诱导多种宫颈癌细胞凋亡和 DNA 损

伤, 然而在该人参单体对食管癌细胞的作用未见报道。本研究通过体外细胞实验证实人参皂苷 Rg5 对食管癌细胞具有抑制增殖作用, 为临床治疗肿瘤开发新型中药提供一定的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

该实验采用的食管癌细胞株 Eca109 细胞由吉林大学第二医院中心实验室保存。

1.1.2 人参皂苷 Rg5

该实验所用人参皂苷 Rg5 单体由吉林大学生命科学院从人参中分离及提供本次实验。

1.1.3 主要试剂及实验耗材

RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自由 NQBB 公司; 青-链霉素双抗购自 Gibco 公司; 凋亡检测试剂盒 Annexin V-FITC/PI 为 BD 公司产品, 周期检测试剂盒购自南京凯基生物公司, CCK-8 为日本同仁产品。37℃ 恒温培养

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (项目编号: 81320108025)

* 通讯作者

箱、酶标仪为 Thermo 公司设备,流式细胞仪为 Beckman 公司仪器。

1.2 方法

1.2.1 食管癌细胞抑制率检测

采用 cck-8 法检测细胞抑制率。取对数生长期的食管癌 Eca109 细胞 4×10^4 /ml, 种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 37℃ 孵育箱中培养 24 h, 并将 Rg5 稀释于不含血清的 RPMI-1640 培养基中, 浓度分别为 6.25、12.5、25、50、100 μ mol/L 共 5 个浓度梯度, 每组 5 个复孔, 同时每组设置对照组(不加药物), 空白组(只含培养基), 细胞种于 96 孔板培养 24 h 后吸去完全培养基, 每孔加入 100 μ l 上诉含有不同药物浓度的培养基, 空白组及对照组也相应加入不含血清培养基, 37℃ 孵育箱继续培养 24 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8, 2h 后酶标仪检测 450 nm 处吸光度。全部细胞抑制率 = (对照组 - 加药组) / (对照组 - 空白组) $\times$ 100%。

1.2.2 细胞生长状态观察

取对数生长期的 Eca109 细胞消化后种于 6 孔板中, 每孔约 3×10^5 个。以每孔 2 ml 完全培养基下 37℃ 培养箱中培育 24 h, 根据药物的浓度曲线及时间曲线, 更换含有 50、100 μ mol/L 药物浓度的不含血清培养基 2 ml 恒温箱培养 24 h, 同时设立对照组(不含药物), 倒置显微镜下观察其形态。

1.2.3 细胞凋亡检测

以 Annexin V FITC/PI 双染色法检测。取对数生长期的 Eca109 细胞消化后种于 6 孔板中, 每孔约 3×10^5 个。以每孔 2 ml 完全培养基下 37℃ 培养箱中培育 24 h, 根据药物的浓度曲线及时间曲线, 更换含有 50、100 μ mol/L 药物浓度的不含血清培养基 2 ml 恒温箱培养 24 h, 同时设立对照组(不含药物)。收集上述细胞及上清, 1 000 rpm 离心 5

min 后弃去上清, 预冷的 PBS 洗 2 次, 用 $1 \times$ 缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1-5 \times 10^6$ /ml, 取 100 μ l 上诉细胞悬液于 5 ml 流式管中, 分别加入 5 μ l Annexin V/FITC 和 5 μ l PI, 室温避光 15 min, 流式细胞仪测定细胞凋亡, 实验重复 3 次。

1.2.4 细胞周期检测

以 PI(碘化丙啶)单染法检测。取对数生长期的细胞种于 6 孔板中, 每孔 3×10^5 个, 2 ml 完全培养基 37℃ 孵育 24 h, 更换含有 Rg5 浓度为 50、100 μ mol/L 的培养基 2 ml 培养 24 h, 同时设对照组。收集培养基, 每孔 1 ml 胰酶消化收集后离心 1 000 rpm、5 min, PBS 洗涤 1 次离心, 弃去上清后加入预冷的体积分数为 70% 乙醇 5 ml 固定, 4℃ 过夜, 800 rpm 离心 5 min 后 PBS 洗去固定液, 加入配好的含有染色缓冲液、Rnase、PI 的染色液 400 μ l, 37℃ 避光水浴 30 min 后进行流式细胞检测, Modfit 软件分析细胞周期, 实验重复 3 次。

1.2.5 统计学分析

应用 SPSS20.0 软件进行处理。实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, t 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 Rg5 对细胞增殖的抑制作用 不同浓度的 Rg5 对 Eca-109 细胞作用后抑制其增殖, 且随着浓度和时间的增加, 其抑制率相应增加, 经过 SPSS 软件分析, 其 24 h 的 IC₅₀ 为 42.95 μ mol/L, 48 h 的 IC₅₀ 为 31.61 μ mol/L, 我们选择近 50、100 μ mol/L 浓度进行以下实验。如表 1。

Rg5 作用 Eca109 细胞的时间不同, 其细胞抑制率不同, 随时间延长其抑制率增加, 以 50 μ mol/L 浓度的 Rg5 观察不同时间对 Eca109 的抑制率, 见表 2。

表 1 不同浓度 Rg5 作用不同时间后细胞抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)

浓度(μ mol/L)	6.25	12.5	25	50	100
抑制率(%)					
24 h	6.34 $\pm$ 1.37	10.97 $\pm$ 0.93	20.32 $\pm$ 2.96	53.43 $\pm$ 1.01	80.89 $\pm$ 1.83
48 h	10.08 $\pm$ 2.13	17.09 $\pm$ 2.25	30.46 $\pm$ 2.12	65.48 $\pm$ 3.26	97.68 $\pm$ 1.62

表 2 50 μ mol/L 的 Rg5 与食管癌细胞作用不同时间抑制率 ($\bar{x} \pm s$, %)

时间(h)	3	6	12	18	24
抑制率(%)	25.41 $\pm$ 1.32	38.47 $\pm$ 1.26	45.25 $\pm$ 2.04	49.28 $\pm$ 2.08	51.71 $\pm$ 3.35

2.2 不同浓度与 Eca-109 细胞作用后生长情况 镜下可见, 随浓度增加, 细胞形态发生明显变化, 其体积变小, 部分出现皱缩、变圆、脱落(图 1)。

2.3 Rg5 对 Eca109 细胞周期的影响 食管癌细胞的周期受到 Rg5 的影响, 随着浓度的增加, 其周期主要阻滞在 G2/M、S 期, 而 G0/G1 比例相对减低。当

以 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用细胞 24 h 后,其 S 期、G2 期与对照组相比,有明显的差异性,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

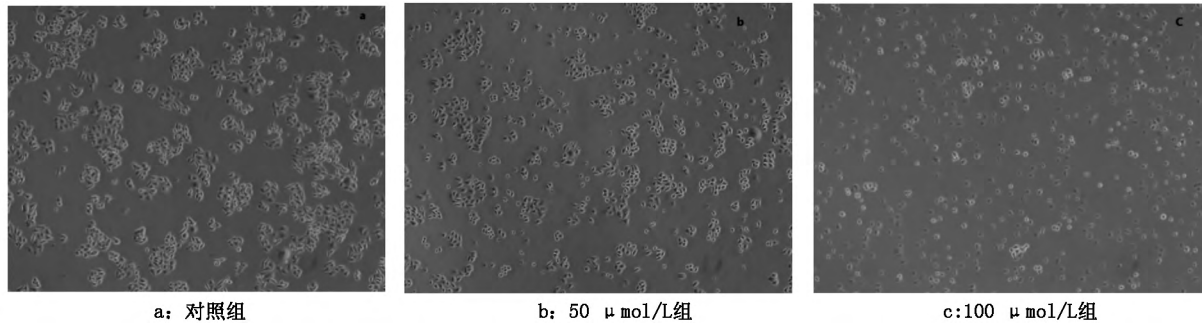


图 1 不同浓度 Rg5 作用 Eca-109 细胞 24 h 后形态观察

表 3 不同浓度 Rg5 与 Eca-109 细胞作用 24 h 后细胞周期变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G0/G1	S	G2/M
对照组	51.64 $\pm$ 3.22	38.22 $\pm$ 2.85	12.14 $\pm$ 2.46
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	21.08 $\pm$ 2.18*	53.08 $\pm$ 3.34*	25.84 $\pm$ 3.08*
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	10.08 $\pm$ 2.41*	58.44 $\pm$ 4.05*	31.48 $\pm$ 4.54*

注: * 与对照组相比, $P < 0.05$

2.4 Rg5 对 Eca109 细胞增殖的影响 分别用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 Rg5 作用 Eca109 细胞后可见细胞凋亡率增加,且随浓度增加其早期凋亡率也增加。当以 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度作用细胞 24 h 后,其早期凋亡率与对照组相比,有明显的差异性,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同浓度 Rg5 作用 Eca109 细胞 24 h 凋亡情况($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	C1	C2	C3	C4
对照组	0.46 $\pm$ 0.48	0.02 $\pm$ 0.01	98.79 $\pm$ 0.69	0.72 $\pm$ 0.48
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.82 $\pm$ 1.13	1.06 $\pm$ 1.40	85.65 $\pm$ 3.61	11.45 $\pm$ 2.39*
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.39 $\pm$ 0.19	0.30 $\pm$ 0.25	69.17 $\pm$ 4.72	30.13 $\pm$ 4.96*

注: C1: 坏死细胞; C2: 晚期凋亡细胞; C3: 正常细胞; C4: 早期凋亡细胞; 与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤的生长是一个复杂的过程,因其不能像正常细胞一样进行程序化凋亡而进行无限增殖,因此,如何诱导肿瘤细胞凋亡或产生细胞周期滞留致使细胞停止分裂或延迟分裂,是药物治疗肿瘤的最基本的几种作用方式。

人参是祖国传统医学中重要的药物,随着医学科技的发展,其多种成分已被分离出来形成单体^[4],其中人参皂苷 Rg3,已被制成抗肿瘤中药应用于临床。Rg5 作为一种新型人参单体,目前正被用于多种研究, Lee YY^[5] 等研究了 Rg5 在 BV2 小胶质细胞中的抗炎作用, Siddiqi^[6] 等报道了其在小鼠成骨细胞中的刺激作用, Chu^[7] 等人研究了人参皂甙 Rg5 通过减弱神经炎症反应改善 STZ 诱导记忆受损大鼠的认知功能障碍和 β -淀粉样蛋白沉积等。本实验通过体外细胞实验证明其对食管癌细胞具有增殖抑制作用,这与之前报道的 Rg5 能诱导其他肿瘤细胞凋亡一致。本实验发现其抑制肿瘤细胞增殖通过影响细胞周期,主要是将细胞周期阻滞在 S 期和 G2

期,从而表现出其细胞毒作用,同时引发肿瘤细胞凋亡,并随着浓度增加,其凋亡率也相应增加。目前已有多项研究证实细胞周期阻滞与细胞周期蛋白的表达有关,而细胞凋亡途径主要有细胞膜途径,线粒体途径和内质网途径三种。当细胞经过药物作用后,经过某一种途径使细胞接受凋亡信号,会使凋亡调控分子进行相互作用,继而诱发细胞凋亡相关蛋白的活化,致使细胞凋亡。Rg5 诱导的细胞周期改变和早期凋亡的发生是否与上游因素有关,还有待进一步研究。总体说来,本次实验证实人参皂苷 Rg5 能在体外实验中抑制食管癌细胞增殖,为临床开发治疗食管癌新药提供一定的实验基础。

参考文献:

- [1] 赫捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(7): 501.
- [2] Shin-jung Kim, An Keun Kim, Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (Panax ginseng Meyer) and ginsenoside Rg5[J]. Journal of Ginseng Research, 2015, 39(2): 125.
- [3] Liang LD, He T, Du TW, et al, Ginsenoside-Rg5 induces apoptosis and DNA damage in human cervical cancer cells[J]. Molecular

Medicine Reports, 2015, 11(2): 940.

[4] 杨金玲, 高丽丽, 朱平. 人参皂苷生物合成研究进展[J]. 药学报, 2013, 48(2): 170.

[5] Lee YY, Park JS, Jung JS, et al. Anti-inflammatory effect of ginsenoside Rg5 in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5): 9820.

[6] Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Ahn S, et al. Stimulative Effect of Ginsenosides Rg5:Rk1 on Murine Osteoblastic MC3T3-E1 Cells[J].

Phytotherapy Research, 2014, 28(10): 1447.

[7] Chu SH, Gu JF, Feng L, et al. Ginsenoside Rg5 improves cognitive dysfunction and beta-amyloid deposition in STZ-induced memory impaired rats via attenuating neuroinflammatory responses[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 317.

(收稿日期: 2016-05-09)

文章编号: 1007-4287(2016)12-1985-02

大鼠 SAMVT 模型中相关实验室指标的检测分析

厉双安¹, 赵金伟^{2*}, 吴杰³, 田维军³, 马震³, 张振文⁴

(1. 长春市中心医院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学第二医院; 3. 吉林省人民医院; 4. 武警吉林省总队医院)

急性肠系膜上静脉血栓形成(SAMVT)是一种罕见的急腹症, 约占急性肠系膜缺血性疾病的 6%-9%, 占急诊入院病人的 1/1000 左右^[1]。随着影像技术的发展, 特别是 CT 门静脉造影术的广泛应用, 使 SAMVT 的早期确诊率明显提高, 敏感性可达 90% 以上, 但对病情的严重性评估价值有限^[2], 寻求合适的血清学标记物有助于疾病的诊断及病情的评估。

为此, 我们采用 Fecl₃ 溶液包裹肠系膜的方法建立大鼠 SAMVT 动物模型^[3], 同时对其发生发展过程中的相关实验室指标进行检测分析, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 大鼠 SAMVT 模型的建立

具体实验方法参见文献^[3]。

1.2 标本的收集

根据文献实验方法, 在不同的时相点, 即在不同的分期内, 分别抽取大鼠静脉血, 并解剖大鼠, 切除病变的肠管及肠系膜, 福尔马林溶液固定后行病理检查, 根据病理检查结果确定分期。每组大鼠 30 只, 结果, 成功抽取静脉血、切除病变组织及抽取腹水进行细菌涂片检查的大鼠如下: 对照组 25 例; 血栓形成组 21 例; 粘膜坏死脱落组 24 例; 肠管坏死、穿孔组 26 例。

1.3 检测指标和方法

外周血血浆肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)及二胺氧化酶(DAO)均采用美国 RD 公司生产的 ELISA 试剂盒进行检测, 严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS11.0 统计软件包分析。

2 结果

1 组分别与 2、3、4 组相对比, P 值均小于 0.05; 2、3 组相对比, P 值大于 0.05; 2 组、3 组分别与 4 组相对比, P 值均小于 0.05。如表 1 所示。

表 1 外周血肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)和二胺氧化酶(DAO)的检测

I-FABP(ng/L)	例数 (N)	I-FABP(ng/L)	DAO(u/L)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
1 正常对照组	25	447.11 ± 108.73	14.67 ± 1.41
2 血栓形成组	21	523.82 ± 93.84	16.07 ± 1.59
3 粘膜坏死脱落组	24	545.82 ± 121.31	17.52 ± 1.43
4 肠壁坏死穿孔组	26	645.42 ± 101.33	17.53 ± 2.08

外周血肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)的检测结果: 1 组分别与 2、3、4 组相对比, P 值均小于 0.05; 2、3 组相对比, P 值大于 0.05; 2 组、3 组分别与 4 组相对比, P 值均小于 0.05。二胺氧化酶(DAO)的检测结果: 1 组与 2、3、4 组相对比, P 值均小于 0.05; 2、3、4 组两组两组相对比, P 值均大于 0.05。

3 讨论

目前, 正在探索一些对诊断具有特异性或相对特异的指标, 比如, D-二聚体是一个敏感但不特异的

基金项目: 吉林省科技厅资助项目 (201005224)

* 通讯作者



知网查重限时 **7折** 最高可优惠 **120元**

本科定稿，硕博定稿，查重结果与学校一致

立即检测

免费论文查重: <http://www.paperyy.com>

3亿免费文献下载: <http://www.ixueshu.com>

超值论文自动降重: http://www.paperyy.com/reduce_repetition

PPT免费模版下载: <http://ppt.ixueshu.com>
