

人参皂苷 Rh2 对低浓度的奥沙利铂诱导 人胃癌 SGC-7901 侧群细胞凋亡的增敏作用

李 靖¹, 郑旭薇², 贾建光¹, 郭晨旭¹, 金 鑫¹, 钱 军¹

[摘要] **目的:**探讨人参皂苷 Rh2(GS-Rh2)是否可以提高胃癌细胞对奥沙利铂(L-OHP)药物作用的敏感性。**方法:**使用流式细胞仪检测并分选胃癌 SGC-7901 的侧群(SP)细胞,使用 CCK-8 试剂盒检测并验证 SP 细胞的高增殖能力,使用 MTT 法检测 GS-Rh2 和 L-OHP 对 SGC-7901-SP 细胞的半数抑制率(IC_{50}),通过流式细胞仪检测 GS-Rh2 联合低浓度的 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞周期及凋亡率的变化,使用 Western blotting 检测 GS-Rh2 和 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞的凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达变化情况。**结果:**胃癌 SGC-7901-SP 细胞的增殖能力明显高于非侧群细胞($P < 0.01$);GS-Rh2 能增强 L-OHP 对 SGC-7901-SP 细胞的敏感性,将细胞增殖阻滞在 G_1 期($P > 0.05$),其 Bax 蛋白表达增高($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.01$),并与 GS-Rh2 浓度呈负相关($P < 0.05$)。**结论:**随着 GS-Rh2 浓度的逐渐增加,GS-Rh2 逐渐提高了 L-OHP 对 SGC-7901-SP 作用的敏感性,GS-Rh2 可作为一种抗肿瘤药物的增敏剂。

[关键词] 胃肿瘤;侧群细胞;人参皂苷 Rh2;奥沙利铂

[中图分类号] R 735.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.001

Sensitization effect of ginsenoside-Rh2 on the apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 side population cells induced by low concentration of oxaliplatin

LI Jing¹, ZHENG Xu-wei², JIA Jian-guang¹, GUO Chen-xu¹, JIN Xin¹, QIAN Jun¹

(1. Department of Surgical Oncology, 2. Operating Room, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical college, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of ginsenoside-Rh2 (GS-Rh2) on the sensitivity of gastric cancer cells treated with oxaliplatin (L-OHP). **Methods:** The side population (SP) cells of human gastric cancers cell line SGC-7901 was screened using flow cytometry (FCM), the proliferation ability of SP cells was detected using CCK-8 kit. The half inhibition concentration (IC_{50}) of GS-Rh2 and L-OHP on SGC-7901 SP cells were detected using MTT assay. The changes of cell cycle and apoptosis rate of SP cells intervened by GS-Rh2 combined with low concentration of L-OHP were detected using FCM, and the level changes of Bax and Bcl-2 protein in SP cells intervened by GS-Rh2 combined with L-OHP were measured using Western-blotting. **Results:** The proliferation capacity of SGC-7901 SP cells was significantly higher than that of non side population ($P < 0.01$). GS-Rh2 could enhance the sensitivity of the L-OHP on SGC-7901-SP cells, block the cell cycle in G_1 phase ($P > 0.05$). The protein expressions of Bax and Bcl-2 increased and decreased, respectively ($P < 0.01$), which was negatively correlated with the GS-Rh2 concentration ($P < 0.05$). **Conclusions:** With the increasing of GS-Rh2 concentration, the GS-Rh2 gradually increases the sensitivity of L-OHP on SGC-7901 SP cells. GS-Rh2 can be acted as a sensitizer of anti-gastric cancer drug.

[Key words] gastric neoplasms; side population cell; ginsenoside-Rh2; oxaliplatin

目前胃癌的治疗主要包括手术、化疗、放疗及靶向治疗等综合治疗^[1],对于晚期胃癌病人,化疗成为综合治疗中较为重要的组成部分。奥沙利铂

(oxaliplatin, L-OHP)是胃癌化疗方案中的常用药物,虽然对于大多数病人来说,L-OHP的应用能取得较好的效果,但是大剂量的使用也会使病人产生相当严重的不良反应^[2],消化系统、呼吸系统、神经系统、血液系统都会受到不同程度的影响。如何能够使最小剂量的L-OHP达到最大程度的治疗效果,从而在消灭癌细胞的同时减轻化疗的不良反应成为我们研究的焦点。

人参是临床上常用的具有抗癌活性的中药之一^[3-5]。研究^[6-7]证明人参抗肿瘤活性的主要成分是人参皂苷。之前的研究表明,人参皂苷有很多亚

[收稿日期] 2018-02-28 [修回日期] 2018-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8117386);安徽省高校自然科学基金项目(KJ2015B040by);蚌埠医学院校自然科学基金项目(BYKY1450)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 肿瘤外科, 2. 手术室, 安徽蚌埠 233004

[作者简介] 李 靖(1987-),男,硕士,主治医师。

[通信作者] 钱 军,硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail: junqianbbmc@126.com

型^[8],其中一个亚型 GS-Rh2(分子式: $C_{36}H_{62}O_8$; 相对分子质量: 622.87)有明显的抗肿瘤效果^[9-11];但是,在临床治疗中,对于体质较差的晚期胃癌病人,单独使用 GS-Rh2 并不能明显改变病人的生存预期,同时我们观察到,对于体质较差的晚期胃癌病人,通过减少 L-OHP 的用量并联合 GS-Rh2 的应用,不仅可以减少病人的不良反应,而且还可以获得很好的治疗效果。鉴于此,我们想通过细胞层面观察人参皂苷在抗肿瘤的同时是否还可以促进 L-OHP 的药物敏感性。我们选择了人胃癌细胞株 SGC-7901-SP 细胞,SP 细胞最早被 GOODEL 等^[12-14]发现,近年来的研究发现,SP 细胞增殖速度比 NSP 细胞快,我们课题组在之前的研究^[15-17]中也得到同样的结果,对于 SP 细胞来说,较高的增殖速度更能体现胃癌细胞的特点。本研究的目的是通过选用高增殖速度的胃癌细胞和低浓度的化疗药物为模型,探讨 GS-Rh2 能否增强 L-OHP 对胃癌细胞的敏感性。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞库;细胞培养基和 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 购自 Hyclone 公司; Penicillin Streptomycin 液购自 Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS)购自天杭生物科技公司;Hoechst 33342、维拉帕米和 L-OHP 购自 Sigma 公司;GS-Rh2(纯度 $\geq 98\%$)购自 Bellancom 公司;CCK-8 和 MTT 试剂盒购自碧云天公司;AV 试剂盒和 PI 购自 BD 公司;RIPA 裂解液购自碧云天公司;Bax、Bcl-2 抗体(兔抗人)购自博士德公司; β -actin(鼠抗人)购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉公司;WBKLS0100 底物显色剂购自 Millipore 公司。使用 BD FACS Aria II 和 BD FACSCalibur 流式细胞仪;使用 BioTeK Synergy 2 电泳仪、凝胶成像系统;使用 Bio-Rad 的凝胶成像系统。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 人胃癌细胞培养于含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下细胞培养箱中培养,每天换液一次,每 3 天细胞一次传代。

1.2.2 细胞分选

选择生长状态良好的细胞用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min,用含 2% 胎牛血清的 PBS 液清洗 2 次。调整

细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞,加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst33342 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度恒温箱中抚育 120 min,抚育结束后,细胞用含 2% 胎牛血清的 PBS 清洗一次。最后使用流式细胞仪(蓝光,402 ~ 446 nm;红光,650 ~ 670 nm)进行 SP 和 NSP 细胞的检测及分选。

1.2.3 细胞增殖能力检测

将分选获得的 SP、NSP 细胞各分为 6 组(每组 3 个孔)加入 96 孔板内,各组分别加入 0(空白对照组)、20、40、60、80、100 μL 的细胞悬液,再在每孔中加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液至总体积为每孔 100 μL 。将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 3 h 贴壁后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,相同条件下培养 3 h 后,测定 490 nm 处吸光度(OD_{490})。分析所得数据,以 JOD_{490} 表示, $\text{JOD}_{490} = \text{样本 OD}_{490} - \text{空白组 OD}_{490}$ 均值(下同),应用统计软件 SPSS 19.0,绘制标准曲线,计算直线拟合度及直线方程。

选取分选后的 SP 和 NSP 细胞分别接种到 96 孔培养板(每组 24 孔, 1×10^3 细胞/孔),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养,第 2 天及第 5 天常规换细胞培养液,于第 6、24、48、72、96、120、144、168 h 各取 3 个孔,加入 10 μL CCK-8,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下继续培养 3 h,读取 490 nm 处吸光度值(JOD_{490}),带入直线方程,换算成细胞数,计算平均值和标准误,连续测定 7 d,绘制细胞增殖曲线图。

1.2.4 测定 L-OHP 及 GS-Rh2 对 SGC-7901-SP 的 IC_{50}

将 SP 细胞接种于 96 孔培养板(每组 24 孔, 5×10^4 细胞/孔),加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液至总体积为每孔 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 24 h 后,加入不同浓度梯度的 L-OHP(0.5 μg 、1 μg 、2 μg 、4 μg 、8 μg 、16 μg 、32 μg)或 GS-Rh2(5 μg 、10 μg 、20 μg 、40 μg 、80 μg 、160 μg 和 320 μg),培养 24 h,加入 20 μg MTT(5 mg/mL),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 4 h,读取 490 nm 处吸光度值(JOD_{490})。

1.2.5 药物干预后细胞周期分析

将分选收集的胃癌 SP 细胞($5 \times 10^5/\text{mL}$)随机分为 8 组,接种于 60 mm 培养皿(2 mL 细胞悬液),分别用 0.9% 氯化钠注射液(空白对照组)、L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (阴性对照)、GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (阴性对照)、L-OHP 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (阳性对照)、L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + GS-Rh2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + GS-Rh2 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + GS-Rh2 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、L-OHP

1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 24 h, 收集细胞, PBS 液洗 2 次, 加入 1 mL 70% 冷乙醇, 冰箱过夜, 然后使用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤细胞, 加入 0.5 mL 含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI 的 PBS 液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 30 min。最后使用流式细胞仪分析细胞周期。

1.2.6 药物干预后细胞凋亡检测 将分选收集的胃癌 SP 细胞 ($5 \times 10^5/\text{mL}$) 随机分为 8 组, 接种于 60 mm 培养皿 (2 mL 细胞悬液), 经上述处理。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 24 h, 收集细胞, PBS 液体洗 2 次, 加入 250 μL PBS, 3 μL Annexin V 和 3 μL PI, 在黑暗中孵育 15 min。最后使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 药物干预后凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 表达变化检测 将分选收集的胃癌 SP 细胞 ($5 \times 10^5/\text{mL}$) 随机分为 8 组, 接种到细胞培养瓶中 (4 mL 细胞悬液), 经上述处理。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度下培养 24 h, 收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次。用细胞裂解液提取全蛋白, 根据 Bax 蛋白相对分子质量 21 000 及 Bcl-2 蛋白相对分子质量 26 000 选择配制 12% 分离胶及 5% 浓缩胶。蛋白质电转移到 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min; 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 8 min。在 P 膜上滴加适量 WBKLS0100 底物显色剂曝光, 扫描曝光, 应用 quantity one 软件 (Bio-Rad) 分析扫描蛋白条带的光密度数据。

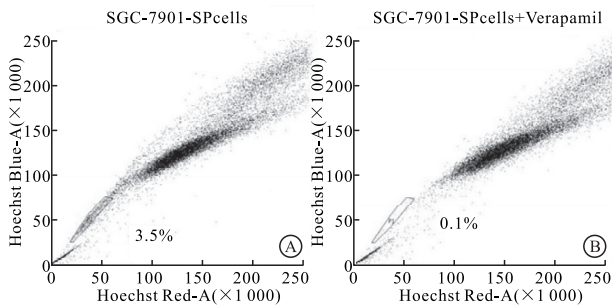
1.3 统计学方法 采用 t 检验、方差分析 (ANOVA) 和 Dunnett- t 检验。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测并分选 SP 细胞 加入 Hoechst 33342 120 min 后, 流式细胞仪检测和分选收集 SP 细胞。分析表明, SP 细胞在胃癌 SGC-7901 细胞中的比例为 $(3.51 \pm 1.56)\%$, 维拉帕米抑制后下降到 $(0.10 \pm 0.05)\%$ ($P < 0.01$) (见图 1 和表 1)。

2.2 SGC-7901-SP 及 NSP 细胞的增殖能力的检测

SGC-7901-SP 细胞标准曲线为 $Y = 5\,886X + 551.6$, Y 值为细胞数, X 值为 JOD_{490} 值直线拟合度 = 0.983, 符合线性关系 ($P < 0.05$); SGC-7901-NSP 细胞标准曲线为 $Y = 7\,640X + 314.69$, Y 值为细胞数, X 值为 JOD_{490} 值直线拟合度 = 0.994, 符合线性关系 ($P < 0.05$) (见表 1)。将检测得到的 SP、NSP 细胞的 OD 值带入标准曲线公式, 换算成细胞数, 绘制增



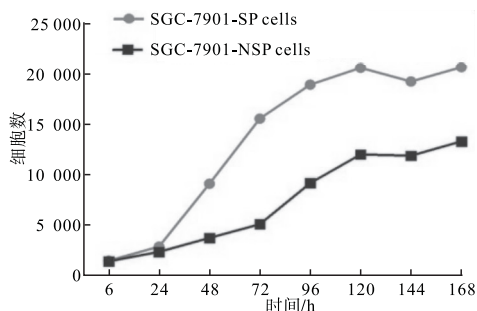
A: 实验组 SP 细胞的检测图; B: 空白对照组 SP 细胞的检测图

图 1 胃癌细胞株 SGC-7901-SP 细胞的检测 SP 和 NSP 在 SGC-7901 细胞中的增殖

殖曲线图并计算 7 d 增殖倍数 (见图 2 和表 2)。

表 1 SGC-7901-SP 及 NSP 细胞标准曲线 JOD_{490} 测定值 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

细胞个数	JOD_{490}	
	SGC-7901-SP 细胞	SGC-7901-NSP 细胞
0	0.002 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001
2 000	0.544 \pm 0.078	0.378 \pm 0.051
4 000	0.915 \pm 0.125	0.559 \pm 0.108
6 000	1.184 \pm 0.162	0.991 \pm 0.182
8 000	1.410 \pm 0.213	1.334 \pm 0.187
10 000	1.711 \pm 0.275	1.683 \pm 0.174
F	68.38	59.26
P	< 0.01	< 0.01
$MS_{\text{组内}}$	0.023	0.035



细胞增殖率 = 168 h 的细胞数量 / 细胞数量为 6 h

图 2 SGC-7901-SP 和 NSP 的细胞增殖能力的对比

表 2 SGC-7901-SP 及 NSP 细胞的 168 h 增殖倍数 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

细胞组	增殖倍数
SGC-7901-SP 细胞	20.90 \pm 0.66
SGC-7901-NSP 细胞	14.10 \pm 0.18
F	197.237
P	< 0.01

注: 细胞增殖率 = 168 h 的细胞数量 / 6 h 的细胞数量

2.3 L-OHP 和 GS-Rh2 对胃癌 SGC-7901-SP 细胞的半数抑制率 (IC_{50}) L-OHP 对 SGC-7901-SP 细胞

的 IC_{50} 为 $14.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, GS-Rh2 对 SGC-7901-SP 细胞的 IC_{50} 为 $425 \mu\text{g}/\text{mL}$ (见表 1)。将 L-OHP 的 IC_{50} 设置为阳性对照, 选择 L-OHP IC_{50} 的 $1/10$ 浓度 $1.45 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为低浓度的标准, 并设为阴性对照。选择 GS-Rh2 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为浓度上限, 并向下建立浓度梯度, 同时将 GS-Rh2 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 设为一实验组作为另一阴性对照组。随着 L-OHP 和 GS-Rh2 浓度的上升, 对 SGC-7901-SP 细胞的 IC_{50} 抑制率均上升 ($P < 0.01$) (见表 3)。

表 3 MTT 法测定不同浓度 L-OHP 及 GS-Rh2 对 SGC-7901-SP 细胞抑制率的比较 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

L-OHP/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率/%	GS-Rh2/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率/%
0.5	4.82 ± 1.05	5	2.12 ± 0.31
1	9.43 ± 1.72	10	3.53 ± 0.67
2	12.61 ± 2.10	20	5.91 ± 1.21
4	17.74 ± 2.23	40	9.87 ± 0.98
8	27.33 ± 1.73	80	15.43 ± 1.32
16	54.21 ± 3.19	160	24.27 ± 2.12
32	90.30 ± 3.56	320	39.83 ± 1.87
<i>F</i>	510.78	—	304.92
<i>P</i>	<0.01	—	<0.01
<i>MS</i> 组内	5.612	—	1.815

2.4 药物干预后细胞周期分析 不同浓度 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞的周期发生明显变化 ($P < 0.01$), 与空白对照组及阴性对照组相比, 实验组 G_0/G_1 期细胞增多 ($P < 0.05$), 而在 S 期和 G_2/M 期细胞减少 ($P < 0.05$)。且与

GS-Rh2 浓度呈正相关 ($P < 0.05$) (见图 3 和表 4)。

2.5 药物干预后细胞凋亡率的改变 不同浓度 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞的凋亡率发生明显变化, 与空白对照组及阴性对照组相比, 实验组的凋亡率逐渐升高 ($P < 0.05$), 与 GS-Rh2 浓度呈正相关 ($P < 0.05$) (见图 4 和表 5)。

2.6 药物干预后细胞凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 表达的改变 不同浓度 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞的凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 的表达发生明显变化 ($P < 0.01$), 与空白对照组及阴性对照组相比, 实验组的 Bax 表达逐渐升高 ($P < 0.05$), 与 GS-Rh2 浓度呈正相关 ($P < 0.05$), Bcl-2 的表达逐渐降低 ($P < 0.05$), 与 GS-Rh2 浓度呈负相关 ($P < 0.05$) (见图 5 和表 6)。

3 讨论

化疗的不良反应严重影响病人的生活质量。虽然减少化疗药物的剂量可以减少不良反应的发生, 但也会影响治疗效果。因此, GS-Rh2 联合低浓度 L-OHP 是否可以达到和高浓度的 L-OHP 诱导胃癌细胞凋亡同样的效果, 成为我们研究的重点。

第一步是胃癌细胞的选择。虽然有很多胃癌细胞系可以选择, 但是考虑到不同的胃癌细胞系不仅分化程度不同, 增殖速度也不同。因此, 我们决定选择一种具有快速增殖特点的胃癌细胞: SP 细胞。在先前的研究中, 大多数学者认为 SP 细胞是一种富含

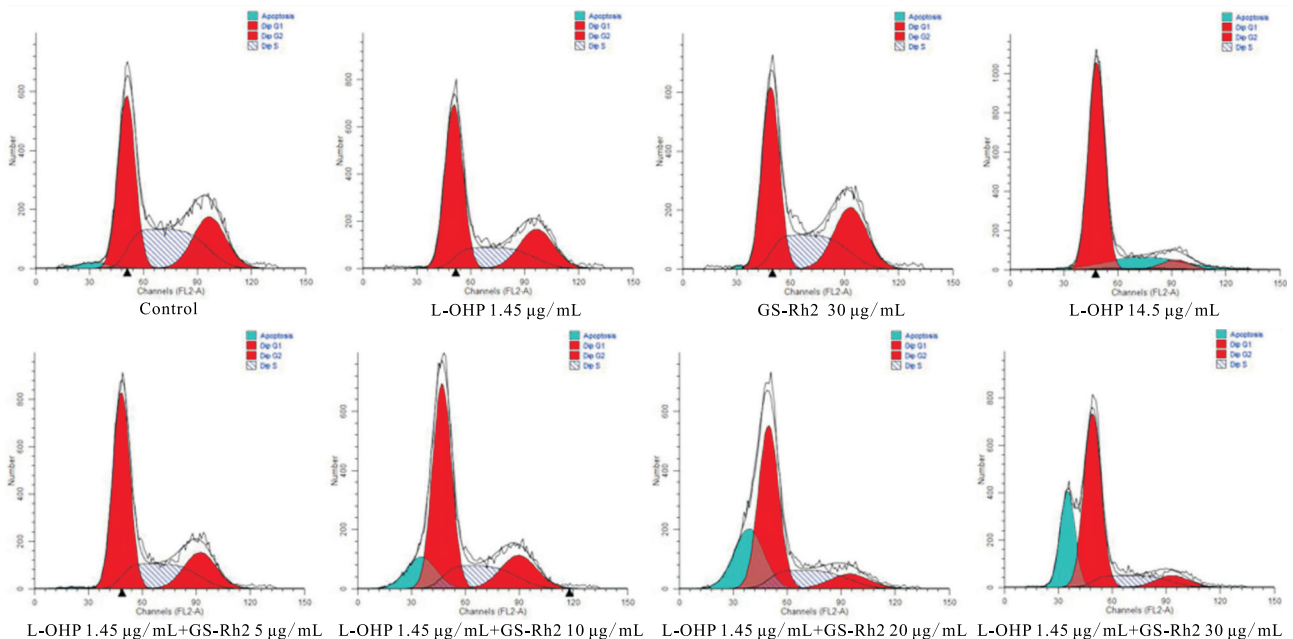


图 3 SGC-7901-SP 在不同浓度的 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后细胞周期变化情况

表 4 不同浓度的 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞周期变化情况 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	(G ₁ /G ₀)/%	(G ₂ /M)/%	S/%
Control	41.08 ± 1.25	23.18 ± 1.19	35.74 ± 1.16
L-OHP 1.45 μg/mL	52.21 ± 1.79	23.60 ± 1.70	24.19 ± 1.29
GS-Rh2 30 μg/mL	43.01 ± 2.97	27.50 ± 0.75	29.49 ± 1.43
L-OHP 14.5 μg/mL	87.69 ± 1.79	7.87 ± 1.12	4.43 ± 1.56
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 5 μg/mL	55.00 ± 3.15 [△]	19.17 ± 1.15 [△]	25.84 ± 2.87
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 10 μg/mL	59.91 ± 3.87 [△]	18.32 ± 2.64 ^{*△}	21.77 ± 2.90 [△]
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 20 μg/mL	65.36 ± 5.12 ^{*△}	14.04 ± 1.12 ^{*△}	20.60 ± 1.85 [△]
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 30 μg/mL	74.77 ± 1.67 ^{*△}	8.23 ± 1.34 ^{*△#}	16.99 ± 1.13 ^{*△}
<i>F</i>	84.67	71.28	71.23
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	8.837	2.183	3.604

注:L-OHP 1.45 μg/mL 组、GS-Rh2 30 μg/mL 组为阴性对照组;L-OHP 14.5 μg/mL 组为阳性对照组;Dunnett-*t* 检验:与 L-OHP 1.45 μg/mL 组比较 * *P* < 0.05;与 GS-Rh2 30 μg/mL 组比较[△]*P* < 0.05;与阳性对照组比较[#]*P* > 0.05

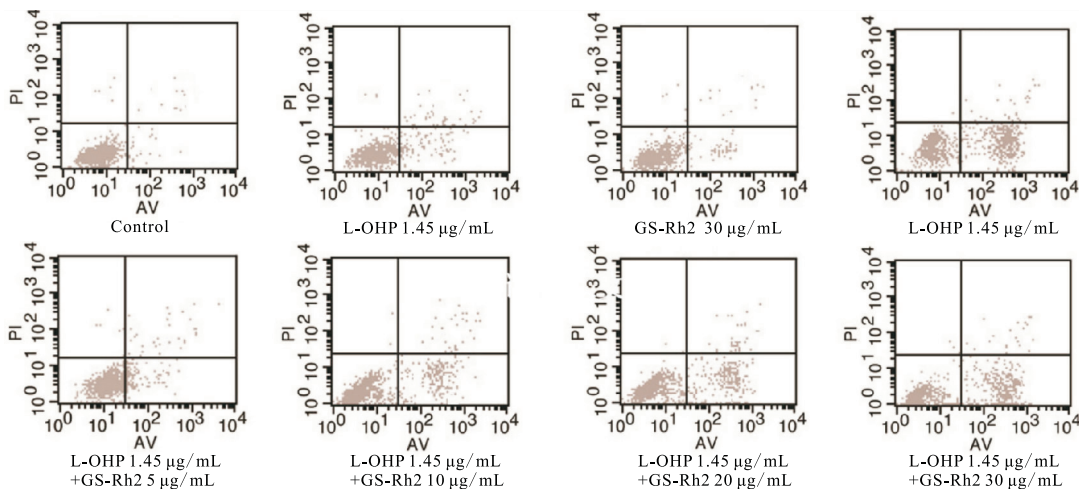


图 4 SGC-7901-SP 细胞在不同浓度的 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后细胞凋亡变化情况

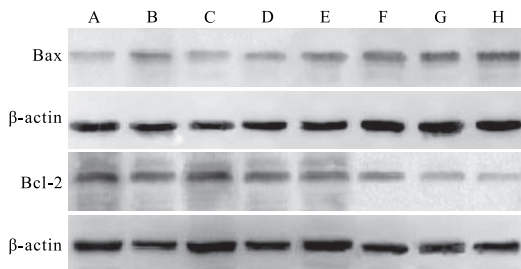
表 5 不同浓度的 GS-Rh2 结合低浓度 L-OHP 干预后 SGC-7901-SP 细胞凋亡率的比较 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	凋亡率
Control	3.56 ± 0.87
L-OHP 1.45 μg/mL	7.91 ± 1.43
GS-Rh2 30 μg/mL	6.28 ± 2.31
L-OHP 14.5 μg/mL	53.73 ± 0.89
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 5 μg/mL	6.71 ± 1.75
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 10 μg/mL	12.12 ± 1.56 ^{*△}
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 20 μg/mL	27.17 ± 0.98 ^{*△}
L-OHP 1.45 μg/mL + GS-Rh2 30 μg/mL	46.58 ± 3.13 ^{*△}
<i>F</i>	372.62
<i>P</i>	<0.01
<i>MS</i> 组内	3.148

注:L-OHP 1.45 μg/mL 组、GS-Rh2 30 μg/mL 组为阴性对照组;L-OHP 14.5 μg/mL 组为阳性对照组;Dunnett-*t* 检验:与 L-OHP 1.45 μg/mL 组比较 * *P* < 0.05;与 GS-Rh2 30 μg/mL 组比较[△]*P* < 0.05

干细胞的一个细胞亚群^[18-20]。当然,有许多学者持否定意见^[21]。但肯定的是,SP 细胞的增殖速度比 NSP 细胞快。这一点在我们之前的研究中也得到了证实。

第二步是选择药物的浓度,以确定实验中 L-OHP 的低浓度标准,我们通过检测 L-OHP 对 SGC-7901-SP 细胞的 IC₅₀ 来确定 L-OHP 的浓度,结果检测出 L-OHP 对 SGC-7901-SP 细胞的 IC₅₀ 为 14.5 μg/mL,我们选择 1/10 的 IC₅₀ (L-OHP 1.45 μg/mL) 作为低浓度的标准,并将 L-OHP 14.5 μg/mL 设为一实验组作为阳性对照。通过检测,L-OHP 1.45 μg/mL 对 SGC-7901-SP 细胞的细胞周期及细胞凋亡影响甚微。因此,我们确定了 1.45 μg/mL 作为低浓度的 L-OHP 的标准,并将 L-OHP 1.45 μg/mL 设为一实验组作为阴性对照。对于 GS-Rh2,在浓度的选择上也存在同样的问题。先前的研究表明,大剂量



A: Control; B: L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C: GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; D: L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E: L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; F: L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; G: L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; H: L-OHP 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图5 SGC-7901-SP细胞在不同浓度的GS-Rh2结合低浓度L-OHP干预后凋亡蛋白BAX/BCL-2表达变化情况

表6 不同低浓度的GS-Rh2结合浓度L-OHP干预后SGC-7901-SP细胞凋亡蛋白Bax/Bcl-2表达的比较 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	Bax	Bcl-2
Control	0.298 \pm 0.087	1.267 \pm 0.218
L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.575 \pm 0.039	0.987 \pm 0.023
GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.349 \pm 0.056	1.179 \pm 0.121
L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.617 \pm 0.078 [△]	0.967 \pm 0.046 [△]
L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.771 \pm 0.043 ^{*△}	0.736 \pm 0.084 ^{*△}
L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.943 \pm 0.079 ^{*△}	0.472 \pm 0.052 ^{*△}
L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.087 \pm 0.082 ^{*△#}	0.286 \pm 0.037 ^{*△#}
L-OHP 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.145 \pm 0.125	0.217 \pm 0.024
F	50.28	50.63
P	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.006	0.010

注:L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为阴性对照组;L-OHP 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为阳性对照组;Dummett-t₂检验:与L-OHP 1.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较^{*} $P < 0.05$;与GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较[△] $P < 0.05$;与阳性对照组比较[#] $P > 0.05$

GS-Rh2本身也可以诱导癌细胞凋亡^[16],为了消除GS-Rh2本身的效果,我们同样检测了GS-Rh2对SGC-7901-SP细胞的 IC_{50} 。结果,检测出GS-Rh2对SGC-7901-SP的 IC_{50} 为425 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。一开始,我们选择1/10的 IC_{50} (42.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验浓度,但结果表明,GS-Rh2 42.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可以显著改变细胞周期和诱导细胞凋亡。我们最终选择了30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为浓度上限(通过检测,GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对SGC-7901-SP细胞的细胞周期及细胞凋亡影响甚微),并向下建立浓度梯度,同时将GS-Rh2 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 设为一实验组作为阴性对照。

细胞周期的中间阶段包括蛋白质合成阶段(G_1)、DNA复制阶段(S)和前有丝分裂阶段(G_2)。在S和 G_2 期增加的细胞数量表明了细胞增殖,但在 G_1 期的细胞周期阻滞表明了细胞分裂的抑制,这最终导致细胞分化、衰老和死亡。根据我们的实验结

果,采用不同浓度的GS-Rh2结合低浓度的L-OHP,显著地降低了SGC-7901-SP细胞在S和 G_2 的比例,而 G_1 细胞则明显增加,这表明GS-Rh2增强了L-OHP限制SP细胞有丝分裂和增殖的能力。在随后的细胞凋亡实验中也证实了这一点。

此外我们选择了Bax/Bcl-2作为检测对象,因为这两种蛋白质的表达变化是细胞凋亡过程中一个敏感的指标^[22]。我们分析了促凋亡蛋白Bax和抗凋亡的Bcl-2蛋白质的表达变化,结果表明,在低浓度的L-OHP中随着GS-Rh2浓度的增加,Bax的表达逐渐增加,Bcl-2的表达逐渐减少。

基于以上的实验结果,我们得出这样的结论:GS-Rh2可以提高L-OHP诱导细胞凋亡的敏感性,同时,GS-Rh2的浓度是影响L-OHP作用的重要指标。

[参考文献]

- [1] SHIROIWA T, FUKUDA T, SHIMOZUMA K. Cost-effectiveness analysis of trastuzumab to treat HER2-positive advanced gastric cancer based on the randomised ToGA trial [J]. Br J Cancer Suppl, 2011, 105(9):1273.
- [2] VIETOR NO, GEORGE BJ. Oxaliplatin-induced hepatocellular injury and ototoxicity: a review of the literature and report of unusual side effects of a commonly used chemotherapeutic agent [J]. J Oncol Pharm Pract, 2012, 18(3):355.
- [3] PARK JY, CHOI P, KIM HK, et al. Increase in apoptotic effect of Panax ginseng by microwave processing in human prostate cancer cells; *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Ginseng Res, 2016, 40(1):62.
- [4] KIM SJ, KIM AK. Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (Panax ginseng Meyer) and ginsenoside Rg5 [J]. J Ginseng Res, 2015, 39(2):125.
- [5] QIAN J, XIE H, GUO CX, et al. Sijunzi decoction demolition parties inhibit proliferation and induce apoptosis of human gastric cancer BGC-823 side population [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2015, 12(6):77.
- [6] ZHENG Y, NAN H, HAO M, et al. Antiproliferative effects of protopanaxadiol ginsenosides on human colorectal cancer cells [J]. Biomed Rep, 2013, 1(4):555.
- [7] DONG H, BAI LP, WONG VK, et al. The *in vitro* structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives [J]. Molecules, 2011, 16(12):10619.
- [8] CHEN F, LUO J, KONG L. Determination of 10 ginsenosides in Panax ginseng of different harvest times based on HPLC fingerprints and principal component analysis [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(9):851.
- [9] YANG Z, ZHAO T, LIU H, et al. Ginsenoside Rh2 inhibits hepatocellular carcinoma through β -catenin and autophagy [J]. Sci Rep, 2016, 6:19383.

(下转第572页)

- suppresses breast cancer growth by down-regulating STAT3 and STAT5b pathways[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e33361.
- [2] 张彦收, 刘运讲. 乳腺癌手术治疗回顾和进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(5): 719.
- [3] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(8): 561.
- [4] LEE HJ, SEO NJ, JEONG SJ, *et al.* Oral administration of penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(6): 804.
- [5] LEE YJ, LEE YM, LEE CK, *et al.* Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(2): 157.
- [6] 栗增, 王江, 周宇, 等. 先导化合物结构优化与策略(三) 通过化学修饰改善水溶性[J]. *药学报*, 2014, 49(9): 1238.
- [7] 李红梅, 李静, 靳伟, 等. 新木脂素的酶法糖基化及抗肿瘤活性[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(11): 1570.
- [8] FAN SH, WANG YY, LU J, *et al.* CERS2 suppresses tumor cell invasion and is associated with decreased V-ATPase and MMP-2/MMP-9 activities in breast cancer[J]. *J Cellular Biochem*, 2015, 116(4): 502.
- [9] 姚广裕, 陈路嘉, 胡晓磊, 等. MT1-MMP 在乳腺癌中的独特表达模式[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(1): 94.
- [10] 范丽梅, 柳响熠, 潘钰, 等. 炎症与肿瘤的关系研究进展[J]. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(5): 432.
- [11] SARODE GS, SARODE SC, PATIL A, *et al.* Inflammation and oral cancer: an update review on targeted therapies [J]. *J Contempor Dental Pract*, 2015, 16(7): 595.
- [12] 陈政纲, 王子珍, 郑传宜, 等. MiR-26b 通过下调 COX-2 表达抑制神经胶质瘤的增殖、侵袭和迁移[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(2): 139.
- [13] HUGO HJ, SAUNDERS C, RAMSAY RG. New insights on COX-2 in chronic inflammation driving breast cancer growth and metastasis [J]. *J Mamm Gland Biol Neoplas*, 2015, 20(3/4): 109.
- [14] 范丽梅, 柳响熠, 潘钰, 等. 炎症与肿瘤的关系研究进展[J]. *江汉大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(5): 432.
- [15] 胡瑛, 李宝兰. 缺氧诱导因子-1 α , 2 α 在恶性肿瘤中不同作用的研究进展[J]. *癌症进展*, 2014, 12(2): 122.
- [16] 陈杨, 石燕, 戴广海. HIF 诱导 EMT 在肿瘤侵袭转移中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2016, 41(8): 872.
- [17] LI W, ZONG S, SHI Q, *et al.* Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in human colorectal cancer cells: involvement of HIF-1 α , Claudin-4, and E-cadherin and vimentin [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37534.
- [18] CHU CY, JIN YT, ZHANG W, *et al.* CAIX is upregulated in COC12-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer[J]. *Intern J Oncol*, 2016, 48(1): 271.
- [19] 丁婕好, 翁苓苓, 王璇, 等. HIF-1 的调控及抗肿瘤相关基因治疗[J]. *中国中西医结合影像学杂志*, 2016, 14(2): 220.

(本文编辑 周洋)

(上接第 566 页)

- [10] CHEN F, DENG ZY, ZHANG B, *et al.* Esterification of ginsenoside Rh2 enhanced its cellular uptake and antitumor activity in human HepG2 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(1): 253.
- [11] KIM MJ, YUN H, KIM DH, *et al.* AMP-activated protein kinase determines apoptotic sensitivity of cancer cells to ginsenoside-Rh2 [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1): 16.
- [12] GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, *et al.* Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797.
- [13] SHAHARUDDIN B, HARVEY I, AHMAD S, *et al.* Characterisation of human limbal side population cells isolated using an optimised protocol from an immortalised epithelial cell line and primary limbal cultures[J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(2): 240.
- [14] LIU HB, MENG QH, DU DW, *et al.* The effects of ABCG2 on the viability, proliferation and paracrine actions of kidney side population cells under oxygen-glucose deprivation [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(10): 1001.
- [15] KONG X, MA MZ, ZHANG Y, *et al.* Differentiation therapy: sesamin as an effective agent in targeting cancer stem-like side population cells of human gallbladder carcinoma [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(1): 254.
- [16] QIAN J, LI J, JIA JG, *et al.* Ginsenoside-Rh2 inhibits proliferation and induces apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 side population cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(4): 1817.
- [17] QIAN J, LI J, JIA JG, *et al.* Different concentrations of sijnunzi decoction inhibit proliferation and induce apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 side population [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13(4): 145.
- [18] LU J, CUI Y, ZHU J, *et al.* Biological characteristics of Rh123 stem-like cells in a side population of 786-O renal carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(6): 1903.
- [19] WANG K, ZENG J, LUO L, *et al.* Identification of a cancer stem cell-like side population in the HeLa human cervical carcinoma cell line [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(6): 1673.
- [20] NIESS H, CAMAJ P, RENNER A, *et al.* Side population cells of pancreatic cancer show characteristics of cancer stem cells responsible for resistance and metastasis [J]. *Target Oncol*, 2015, 10(2): 215.
- [21] NAKAYAMA M, OGASAWARA S, *et al.* Side population cell fractions from hepatocellular carcinoma cell lines increased with tumor dedifferentiation, but lack characteristic features of cancer stem cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(5): 1092.
- [22] NAKATA B, MUGURUMA K, HIRAKAWA K, *et al.* Predictive value of Bcl-2 and Bax protein expression for chemotherapeutic effect in gastric cancer. A pilot study [J]. *Oncology Basel*, 1998, 55(6): 543.

(本文编辑 刘璐)