DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.06.007

·基础研究·

人参皂苷Rg3通过PI3K/AKT信号系统调控*CaM*基因表达促进胃癌BGC-823细胞的凋亡

石燕燕，李树才，孙军（锦州市中心医院 消化内科，辽宁 锦州 121001）

［摘 要］ **目的：**探讨人参皂甙Rg3通过PI3K/AKT信号通路干扰*CaM*基因的表达及对胃癌BGC-823细胞凋亡的影响。**方法：**胃癌BGC-823细胞的培养与传代完成后，Western blotting检测胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1，IGF-1)和/或Rg3分别作用胃癌BGC-823细胞后p-AKT和CaM蛋白表达水平，MTT法检测IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞增殖的影响，Transwell法检测IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞侵袭的影响，流式细胞术检测IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞凋亡的影响。**结果：**随着IGF-1作用时间延长，胃癌BGC-823细胞中p-AKT蛋白和CaM蛋白的表达水平均明显提高（均P<0.05）；与空白对照组比较，Rg3组明显抑制胃癌BGC-823细胞增殖，而IGF-1组和IGF-1+Rg3组明显促进胃癌BGC-823细胞增殖（均P<0.05）；与空白对照组比较，Rg3组明显降低胃癌BGC-823细胞侵袭，而IGF-1组和IGF-1+Rg3组明显促进胃癌BGC-823细胞侵袭能力（均P<0.05）；流式细胞术检测显示，与空白对照组比较，Rg3组明显促进胃癌BGC-823细胞凋亡，而IGF-1组和IGF-1+Rg3组明显抑制胃癌BGC-823细胞凋亡（均P<0.05）。**结论：**人参皂甙Rg3通过阻断PI3K/AKT信号通路来抑制*CaM*的表达，进而促进胃癌BGC-823细胞的凋亡。

［关键词］ 人参皂苷Rg3；钙调蛋白；*CaM*基因；胃癌；BGC-823细胞；凋亡
［中图分类号］ R735.2; R392.1 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1007-385X（2018）06-0590-05

Ginsenoside Rg3 regulates *CaM* gene expression through PI3K/AKT signal system to promote apoptosis of gastric cancer BGC-823 cell

SHI Yanyan, LI Shucai, SUN Jun（Central Hospital of Jinzhou City, Jinzhou 121001, Liaoning, China）

[Abstract] Objective: To investigate Ginsenoside Rg3 interfering the expression of *CaM* through PI3K/AKT signaling pathway to affect the biological activity of gastric cancer BGC-823 cells. **Methods:** After the culture and passage of gastric cancer BGC-823 cells, Western blotting was used to detect the expression of p-AKT and *CaM* protein in gastric cancer BGC-823 cells treated with IGF-1 and/or Rg3; The effect of IGF-1 and/or Rg3 on the proliferation of BGC-823 cells was detected by MTT assay; The effect of IGF-1 and/or Rg3 on the invasion of BGC-823 cells was detected by Transwell assay; Effect of IGF-1 and/or Rg3 on apoptosis of BGC-823 cells was detected by Flow Cytometry. **Results:** Western blotting results showed that the expression of p-AKT and *CaM* protein increased in BGC-823 cells with the prolongation of IGF-1 treatment (all P<0.05); Compared with the blank control group, Rg3 significantly inhibited the proliferation of BGC-823 cells, while IGF-1 and IGF-1+Rg3 significantly promoted the cell proliferation (all P<0.05); Compared with the blank control group, Rg3 significantly reduced the invasion of BGC-823 cells, while IGF-1 and IGF-1+Rg3 significantly promoted the invasion of BGC-823 cells (all P<0.05);Flow cytometry showed that compared with the blank control group, Rg3 significantly promoted the apoptosis of BGC-823 cells, while IGF-1 and IGF-1+Rg3 significantly inhibited the apoptosis of BGC-823 cells (all P<0.05). **Conclusion:** Ginsenoside Rg3 inhibits the expression of *CaM* by blocking PI3K/AKT signaling pathway, thereby promoting the apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells.

[Key words] ginsenoside Rg3; calmodulin; *CaM* gene; gastric cancer; BGC-823 cell; apoptosis
[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(6): 590-594. DOI：10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.007]

［基金项目］ 辽宁省自然科学基金项目（No. 2016010330-301）。 Project supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province（No. 2016010330-301）

［作者简介］ 石燕燕（1978-），女，硕士，主治医师，主要从事肿瘤生物治疗的研究，E-mail：canghaiguanri@126.com

PI3K/AKT信号通路在肿瘤细胞生物学功能的调节过程中起到十分重要的作用[1-2]。AKT又称为蛋白激酶B(protein kinase B，PKB)，是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其作为PI3K的下游靶蛋白，在PI3K/AKT信号通路的转导过程中发挥着核心作用[3-4]。钙调蛋白(calmodulin，CaM)是一种广泛存在于生物体的Ca^{2+}结合蛋白。研究[5-6]发现，Ca^{2+}\CaM信号通路活性的改变可以明显影响肿瘤细胞的生长方式。在许多细胞中CaM的表达与PI3K/AKT信号通路具有很好的相关性，且在基因水平上*CaM*也与*AKT* mRNA表达水平相关[7]。因此，PI3K/AKT信号通路在调控肿瘤细胞内CaM的表达过程中上起了十分重要的作用。人参皂苷Rg3是存在于中药人参中的西环三萜皂苷，其结构式为C42H72013。研究[8]证实，人参皂苷Rg3可以通过抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤转移、增强患者免疫功能等方面来抑制肿瘤的生长。有研究[9]报道，人参皂苷Rg3对多种肿瘤细胞及其表达的*VEGF*、*bFGF*、*MMPs*、*EphA2*等基因都具有明显的抑制作用，进而抑制肿瘤细胞新生血管的形成，从而促进肿瘤细胞的凋亡。同时还有研究[10]表明，人参皂苷Rg3可以通过影响PI3K/AKT信号通路的表达来抑制多种肿瘤细胞的生长。近年来有研究[11]已经证实，人参皂苷Rg3可以通过抑制CaM的表达来促进胃癌BGC-823细胞的凋亡，但其具体机制不详。因此，本研究将进一步研究人参皂苷Rg3是否是通过抑制PI3K/AKT信号通路的活性来降低*CaM*基因的表达，进而实现促进胃癌BGC-823细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人胃癌BGC-823细胞（中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所）。二甲基亚砜、DMEM、RPMI1640、胎牛血清、胰酶（Sigma公司），青霉素、链霉素（大连美罗制药厂），四甲基偶氮唑蓝（MTT）（Biosharp公司），Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒（欣博盛生物科技有限公司），鼠抗人CaM单克隆抗体、鼠抗人AKT单克隆抗体及山羊抗鼠IgG（中杉金桥公司），胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1，IGF-1)（Copoeia公司）

1.2 胃癌BGC-823细胞的培养与传代

人胃癌BGC-823用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的Leibovitz's L-15培养基，在5%CO_2、37 ℃饱和湿度的恒温培养箱中培养。待细胞汇合至80%～90 %时，用0.25%胰蛋白酶消化1～2 min，倒置显微镜下观察细胞形态。当细胞质回缩、细胞间隙变大、细胞有变圆趋势时，反复吹打贴壁细胞，使细胞脱离瓶壁充分分散，传到新培养瓶中，继续培养。实验分组：空白对照组、Rg3（20 μg/ml）组、IGF-1（25 ng/ml）组和Rg3+IGF-1组。增殖抑制率(%)=（对照组*D*值-实验组*D*值）/（对照组*D*值-空白组*D*值）×100%。

1.3 MTT法检测胃癌BGC-823细胞的增殖率

取对数期生长的人胃癌BGC-823细胞，0.25%胰蛋白酶消化，在培养液中制成单细胞悬液，调整细胞密度至5×10^4/ml。将细胞悬液接种于96孔板每孔200 μl，37 ℃、5% CO_2条件下培养。每组设4个平行孔，每孔体积为200 μl。按上述分组药物作用48 h后，每孔加入浓度为5 mg/ml MTT 20 μl，相同培养条件下继续培养4 h。吸去培养液，每孔加入150 μl DMSO，避光，恒温振荡器上振10 min，孵育20 min。放入酶标仪，以490 nm波长检测光密度(*D*)值。实验重复3次。

1.4 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡率

取对数期生长的人胃癌BGC-823细胞，以5×10^5/ml接种于培养瓶中，每孔2 ml，加入适量Leibovitz's L-15培养液培养24 h。待细胞贴壁后，吸去培养液，按上述分组药物作用48 h后，收集细胞，1500×*g*离心10 min，弃上清，用4 ℃预冷的PBS洗涤细胞2次，用重新悬浮细胞，调整细胞密度为1×10^6/ml。取195 μl细胞悬液于5 ml流式管中，加入5 μl Annexin V-FITC，轻轻混匀后间隔3 min，再加入10 μl或20 μg/ml的PI溶液，混匀后于室温避光孵育10 min，加入300 μl结合缓冲液，轻轻混匀，用流式细胞仪测定细胞凋亡率。实验重复3次。

1.5 Transwell实验检测胃癌BGC-823细胞的侵袭能力

将Matrigel与L-15培养基按1∶4稀释，在Transwell上室中加入40 μl的Matrigel稀释液，37 ℃中孵育12 h，使胶凝固。按上述分组药物作用48 h后，各组BGC-823细胞用含0.1% BSA的无血清培养基重新悬浮，调整细胞密度为2×10^5/ml。取100 μl细胞加入上室，500 μl含血清培养基加入下室，每组设3个复孔，于CO_2孵箱培养48 h后，取出小室，用棉签沾取PBS轻轻擦掉上膜细胞，小室以甲醇固定15 min，PBS洗涤3次，每次5 min；结晶紫染色15 min，PBS洗涤3次，每次5 min后镜下观察，每个滤膜随机取5个视野(×100)，取均值计数，照相分析。实验重复3次。

1.6 Western blotting检测BGC-823细胞相关蛋白的表达

按上述分组药物作用48 h后，收集各组细胞以冷，PBS清洗2次，以裂解缓冲液提取总蛋白，蛋白浓度参照BCA试剂盒测定。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)分离。通过电转仪将凝胶上的蛋白样品移至PVDF膜上，5%脱脂奶粉在37 ℃封闭2 h。分别与1∶500鼠抗人CaM单克隆抗体、1∶1 000鼠抗人AKT单克隆抗体。TBST洗膜3次，每次10 min，后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠IgG(1∶200)及山羊抗兔IgG(1∶200)，4 ℃孵育2 h。洗膜3次后用化学发光底物显影，凝胶成像。

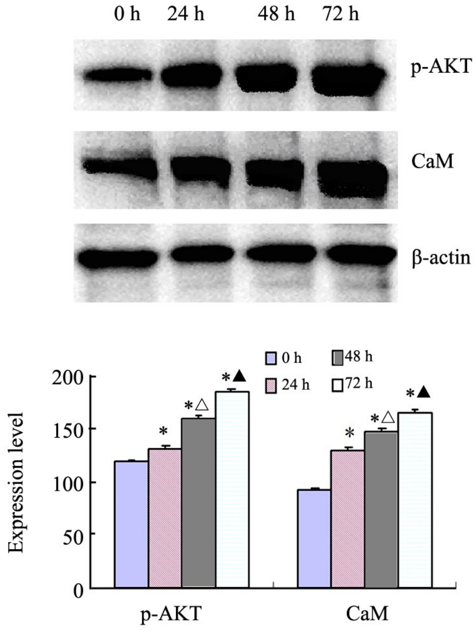
1.7　统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件，计数资料以百分率(%)表示，组间比较采用χ^2检验；计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析。以$P<0.05$或$P<0.01$表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　IGF-1能提高BGC-823细胞p-AKT及CaM蛋白表达水平

在胃癌BGC-823细胞中加入IGF-1分别作用0、24、48、72 h，观察其对p-AKT和CaM的蛋白表达的影响。Western blotting检测结果(图1)显示，随着作用时间的延长，p-AKT蛋白的表达水平明显提高，同时CaM蛋白的表达水平也随之提高。



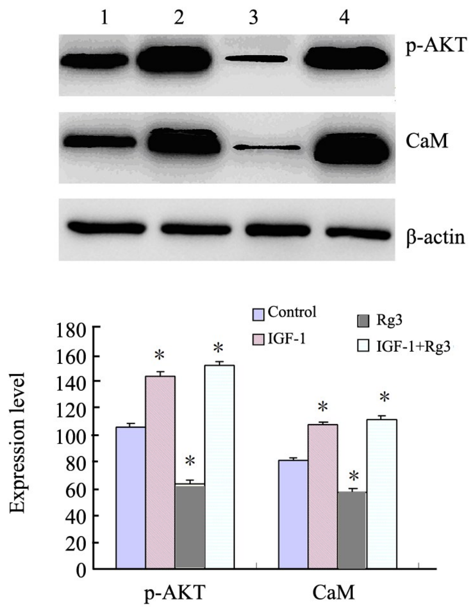
$^{*}P<0.05$ *vs* 0 h group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* 24 h group;
$^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* 48 h group

图1　IGF-1干预后胃癌BGC-823细胞内CaM和p-AKT蛋白表达水平

Fig.1　Expression of CaM and p-AKT protein in gastric cancer BGC-823 cells after IGF-1 intervention

2.2　IGF-1和/或Rg3影响p-AKT及CaM蛋白的表达

将IGF-1和/或Rg3分别作用于胃癌BGC-823细胞中48 h，Western blotting检测结果(图2)显示，与空白对照组比较，IGF-1组和IGF-1+Rg3组p-AKT和CaM蛋白的表达水平明显增强($P<0.05$)，而Rg3组p-AKT和CaM蛋白的表达水平均被抑制($P<0.05$)。表明Rg3可以抑制胃癌BGC-823细胞中CaM的表达，但当增强p-AKT的表达时Rg3的这种抑制作用被明显降低。



$^{*}P<0.05$ *vs* Control group
1:Control group; 2: IGF-1 group;
3:Rg3 group; 4:IGF-1+Rg3 group

图2　IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞内p-AKT和CaM蛋白表达的影响

Fig.2　The effect of IGF-1 and/or Rg3 treatment on the expressions of p-AKT and CaM protein in gastric cancer BGC-823 cells

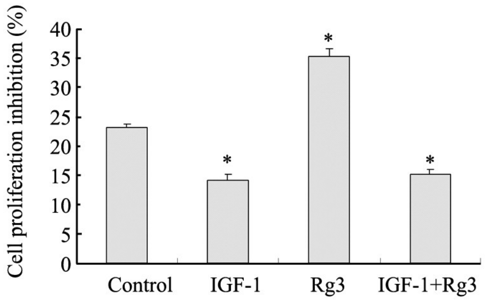
2.3　IGF-1和/或Rg3影响胃癌BGC-823细胞增殖能力

作用48 h后，MTT检测结果(见图3)显示，空白对照组细胞增殖抑制率为(23.25±1.96)%；IGF-1组细胞增殖抑制率为(14.36±1.34)%，Rg3组细胞增殖抑制率为(35.58±2.13)%；IGF-1和/或Rg3组细胞增殖抑制率为(15.72±1.02)%。表明Rg3能够明显抑制胃癌BGC-823细胞增殖，但当PI3K/AKT信号通路被激活时Rg3的这种作用被明显抑制。

2.4　IGF-1和/或Rg3影响胃癌BGC-823细胞的侵袭能力

Transwell检测结果(图4)显示,空白对照组侵袭细胞数为(53.3±2.0)个，Rg3组侵袭细胞数为(35.1±3.0)个，IGF-1组和IGF-1+Rg3组作用胃癌BGC-823细胞48 h后，侵袭细胞数分别为(89.2±

7.1）和（91.2±6.3）个。表明Rg3能够明显降低胃癌BGC-823细胞的侵袭能力，但当PI3K/AKT信号通路被激活时Rg3的这种作用被明显抑制。



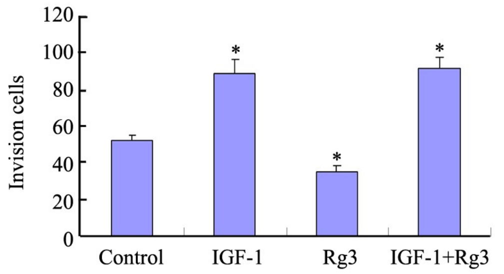
*P<0.05 *vs* Control group

图3 IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effect of IGF-1 and/or Rg3 treatment on the proliferation of gastric cancer BGC-823 cells

2.5 IGF-1和/或Rg3影响胃癌BGC-823细胞的凋亡

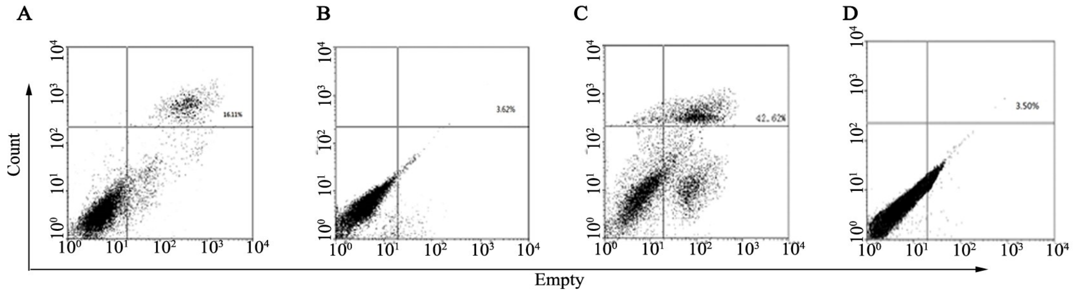
采用AnnexinⅤ-FITC/PI双染色转染各组细胞，检测IGF-1和/或Rg3诱导胃癌BGC-823细胞的凋亡情况。流式细胞术检测结果(图5)显示，Rg3组、IGF-1组、IGF-1+Rg3组和空白对照组细胞凋亡率分别为（42.62±4.15）%、（3.62±0.25）%、（3.50±0.31）%和（16.11±1.21）%。与空白对照组比较，IGF-1组和IGF-1+Rg3组明显抑制细胞凋亡(*P*<0.05)，而Rg3组明显促进细胞凋亡(*P*<0.05)。表明Rg3可以明显促进胃癌BGC-823细胞凋亡，但当PI3K/AKT信号通路被激活时Rg3的这种作用被明显抑制。



*P<0.05 *vs* Control group

图4 IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞侵袭能力的影响

Fig. 4 The effect of IGF-1 and/or Rg3 treatment on the invasiveness of gastric cancer BGC-823 cells



A：Control group；B：IGF-1 group；C：Rg3 group；D：IGF-1+Rg3 group

图5 IGF-1和/或Rg3对胃癌BGC-823细胞凋亡的影响

Fig.5 The effect of IGF-1 and/or Rg3 treatment on the apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells

3 讨 论

人参皂甙Rg3具有独特的抗肿瘤作用，备受广大学者的重视。有研究[12-13]报道，人参皂甙Rg3对多种肿瘤细胞起作用，如对乳腺癌、口腔癌细胞等具有促凋亡和抑制侵袭、转移作用，但具体机制尚不十分清楚。信号转导通路的异常改变在肿瘤细胞的发生发展中起重要的作用，其中PI3K/AKT信号通路是体内众多生长因子发挥作用的共同通路，其异常激活与体内许多癌症的发生密切相关[14]。肿瘤细胞可以在特定条件下激活PI3K/AKT信号通路，从而诱导肿瘤细胞增殖、分化，避免肿瘤细胞发生凋亡[15-16]。为了证实在胃癌BGC-823细胞中PI3K/AKT信号通路与CaM蛋白表达之间的确存在着相互联系，本研究使用激活剂IGF-1来干扰AKT的磷酸化过程，通过Western blotting检测观察其对胃癌BGC-823细胞中p-AKT和CaM的蛋白表达的影响。研究结果发现，在IGF-1的作用下胃癌BGC-823细胞中p-AKT蛋白的表达水平被显著的增强，并且这种调控作用呈现很好的时间效应关系。表明在胃癌BGC-823细胞中PI3K/AKT信号通路可以调节CaM蛋白的表达，两者之间呈正相关。

为了进一步明确人参皂甙Rg3是否是通过PI3K/AKT信号通路来抑制CaM的表达，进而促进胃癌BGC-823细胞的凋亡，本研究通过IGF-1联合人参皂

甙Rg3作用于胃癌BGC-823细胞，观察胃癌BGC-823细胞中p-AKT和CaM蛋白表达的变化与胃癌BGC-823细胞增殖、侵袭和凋亡之间的关系。本研究结果发现，与空白对照组相比，人参皂甙Rg3作用于胃癌BGC-823细胞后，p-AKT和CaM的蛋白表达均明显被抑制，同时胃癌BGC-823细胞的增殖活性明显下降、凋亡明显增加，而IGF-1组和IGF-1+Rg3组胃癌BGC-823细胞内p-AKT和CaM蛋白的表达均明显增强，同时胃癌BGC-823细胞的增殖活性明显增强、凋亡也明显减少。表明Rg3可以明显促进胃癌BGC-823细胞凋亡，但当PI3K/AKT信号通路被激活时Rg3促进胃癌BGC-823细胞凋亡的这种作用被明显抑制。

综上所述，人参皂甙Rg3干扰胃癌BGC-823细胞内CaM的表达来促进胃癌BGC-823细胞凋亡的作用是通过影响PI3K/AKT信号通路活性来得以实现的。

[参 考 文 献]

[1] ROBBINS H L, HAGUE A. The PI3K/AKT pathway in tumors of endocrine tissues[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2015, 6(3): 188-195. DOI:10.3389/fendo.2015.00188.

[2] FANG W L, HUANG K H, LAN Y T, et al. Mutations in PI3K/AKT pathway genes and amplifications of PIK3CA are associated with patterns of recurrence in gastric cancers[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 6201-6220.DOI:10.18632/oncotarget.6641.

[3] VASUDEVAN K M, BARBIE D A, DAVIES M A, et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer[J]. Cancer Cell, 2009, 16(1): 21-32. DOI:10.1016/j.ccr.2009.04.012.

[4] CHAO X, ZAO J, XIAO Y G, et al. Blocking of PI3K/AKT induces apoptosis by its effect on NF-κB activity in gastric carcinoma cell line SGC7901[J]. Biomed Pharmacother,2010 ,64(9):600-604. DOI: 10.1016/j.biopha.2010.08.008.

[6] CUDDAPAH V A, SONTHEIMER H. Molecular interaction and functional regulation of clc-3 by Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase ii (camkii) in human malignant glioma[J]. J Biol Chem, 2010, 285(15): 11188-11196. DOI: 10.1074/jbc.M109.097675.

[7] ZHOU T T, QUAN L L, CHENL P, et al. SP6616 as a new Kv2.1 channel inhibitor efficiently promotes B-cell survival involving both PKC/Erk1/2 and CaM/PI3K/AKT signaling pathways[J]. Cell Death Dis, 2016 , 7(5): e2216[2018-03-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917657/. DOI: 10.1038/cddis.2016.119.

[8] ZHANG F, LI M, WU X, et al. 20(S)-ginsenoside Rg3 promotes senescence and apoptosis in gallbladder cancer cells via the p53 pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9（44）: 3969-3987. DOI: 10.2147/DDDT.S84527.

[9] TIAN L, SHEN D, LI X, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4[J]. Oncotarget, 2016, 7(2): 1619-1632. DOI: 10. 18632/oncotarget.6451.

[10] ZENG D, WANG J, KONG P, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits HIF-1 and VEGF expression in patient with acute leukemia via inhibiting the activation of PI3K/AKT and ERK1/2 pathways[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5):2172-2178.

[11] 孙大鹏, 顾立学, 李晨光, 等. 人参皂苷Rg3通过人乳腺珠蛋白A促进乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6):615-619. DOI：10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.007.

[12] KIM B M, KIM D H, PARK J H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits constitutive activation of NF-κB signaling in human breast cancer (MDA-MB-231) cells: ERK and AKT as potential upstream targets [J]. J Cancer Prev, 2014, 19(1): 23-30.

[13] LIU T, ZHAO L, ZHANG Y, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 targets HIF-1a to block hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2014, (9): e103887[2017-03-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC0103887. DOI: 10.1371/journal.pone.0103887

[14] REN W, LIU Y H, WAN S H, et al. BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(5): e96816[2018-03-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4013047/. DOI:10.1371/journal.pone.0096816.

[15] 赵雅璞, 孙旸, 黄素辉, 等. IL-6经PI3K/AKT通路诱导卵巢癌细胞对他莫西芬耐药[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 601-607. DOI：10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.005.

[16] CHEN R Q , LIY N, RALPH B, et al. Implications of PI3K/AKT inhibition on REST protein stability and neuroendocrine phenotype acquisition in prostate cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 84863-84876. DOI: 10.18632/oncotarget.19386.

[收稿日期] 2018-02-12 [修回日期] 2018-04-10

[本文编辑] 王映红