

人参皂苷 Rg3 对人晶状体上皮细胞生长的抑制作用

赵颖, 刘丹

基金项目: 中国辽宁省教育厅资助项目 (No. 2009A457)

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 赵颖, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障的基础与临床研究。

通讯作者: 刘丹, 女, 主任医师, 教授, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究. yankeliudan@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-04 修回日期: 2010-11-30

Effects of ginsenoside Rg3 on proliferation of cultured human lens epithelial cells

Ying Zhao, Dan Liu

Foundation item: Supported by Liaoning Education Department, China (No. 2009A457)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yankeliudan@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-04 Accepted: 2010-11-30

Abstract

• **AIM:** To investigate the action of Rg3 in the inhibition of human lens epithelial cells SRA01/04 *in vitro* and its possible mechanism.

• **METHODS:** SRA01/04 cells were cultured in medium containing 10% fetal bovine serum. 10, 20, 40, 80, 120, 160 μg/mL Rg3 was added in medium respectively in experimental group, and the control group was set without Rg3. Effects of Rg3 on SRA01/04 proliferation were evaluated by MTT colorimetric assay. The morphology change of SRA01/04 cells was observed by the acridine orange (AO)/ ethidium bromide (EB) staining. The flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of SRA01/04 cells at 48 hours after Rg3 treated.

• **RESULTS:** The inhibiting rate of Rg3 on SRA01/04 cells was gradually enhanced in 10, 20, 40, 80, 120, 160 μg/mL Rg3 added group, showed a dose-dependent and time-dependent manner. We could observe the phenomena of budding and the formation of apoptosis body by fluorescent microscope. The apoptotic rates of SRA01/04 cells showed an increasing tendency in Rg3 added group with increase of Rg3 concentration ($F=15.326$, $P=0.000$).

• **CONCLUSION:** Rg3 can remarkably inhibit the proliferation

and induce the apoptosis of SRA01/04 *in vitro*.

• **KEYWORDS:** human lens epithelial cells; ginsenoside Rg3; apoptosis

Zhao Y, Liu D. Effects of ginsenoside Rg3 on proliferation of cultured human lens epithelial cells. *Gujing Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):25-27

摘要

目的: 观察人参皂苷 Rg3 对体外人晶状体上皮细胞 SRA01/04 生长的抑制作用。

方法: 不同质量浓度的 Rg3 处理体外培养 SRA01/04 细胞后, 应用 MTT 比色法分析其细胞生长抑制作用; AO/EB 染色法观察细胞的形态学改变; 流式细胞仪测定 48h 细胞凋亡率。

结果: Rg3 在一定范围内抑制 SRA01/04 细胞生长, 其抑制率随时间和质量浓度增加而增加。AO/EB 染色可见实验组 SRA01/04 细胞核着黄色荧光或橘红色荧光, 细胞核呈固缩状或圆珠状。流式细胞仪检测凋亡率随药物质量浓度增加而增加。

结论: Rg3 能有效抑制 SRA01/04 细胞增殖, 并诱导其凋亡。

关键词: 人晶状体上皮细胞; 人参皂苷 Rg3; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.009

赵颖, 刘丹. 人参皂苷 Rg3 对人晶状体上皮细胞生长的抑制作用. 国际眼科杂志 2011;11(1):25-27

0 引言

后发性白内障 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障囊外摘出术后影响视力的最常见并发症。发生率在术后 5a, 成人 30% ~ 43%, 儿童达 100%。多数患者需再次手术或行激光后囊切开术, 以致增加了视网膜脱离、黄斑囊样水肿、继发性青光眼及人工晶状体激光损伤等并发症的危险。因此研究如何有效防治 PCO 有重要的临床意义。人参皂苷 Rg3 是存在于传统中药人参中的一种微量的四环三萜皂苷, 作用于细胞周期, 抑制蛋白质合成, 使细胞增殖速度减慢, 还可通过下调血管内皮细胞 bFGF 基因表达, 明显抑制新生血管的形成, 具有抗缺血再灌注损伤、清除氧自由基、抗氧化和阻滞钙通道等多种生物学效应。目前 Rg3 主要用于抗肿瘤、提高免疫功能。我们研究 Rg3 对人晶状体上皮细胞 SRA01/04 增殖和其凋亡的影响, 为拓展 Rg3 可能成为防治 PCO 的新药物提供实验基础和理论依据。

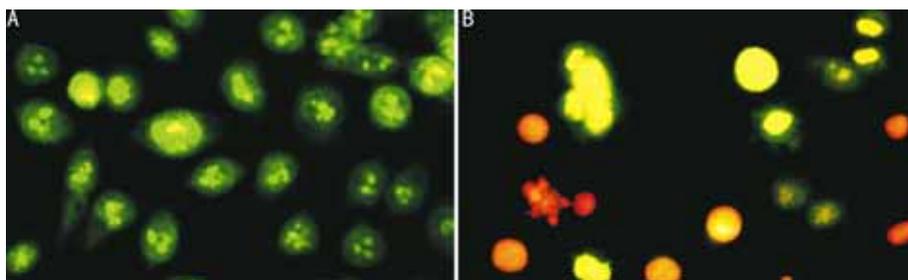


图1 SRA01/04 形态学变化(AO/EB 染色 $\times 400$) A:对照组;B: 80mg/L Rg3 作用 48h。

1 材料和方法

1.1 材料 人参皂苷 Rg3 粉剂(购自吉林大学基础医学院天然药物化学研究室), MTT 粉(Sigma), MEM 培养基、新生胎牛血清、非必需氨基酸(Hyclone), 吖啶橙(AO)及溴化乙啶(EB)粉末(北京鼎国生物公司), 酶标仪 DTX880(美国贝克曼), 荧光显微镜 HB-10104A(日本尼康), 流式细胞分析仪 SXL(COULTER EPICS)。人晶状体上皮细胞株 SRA01/04, 购自中国医学科学院肿瘤研究所。复苏后加入 MEM 完全培养基(胎牛血清 100mL/L, 青霉素 100kU/L, 链霉素 100mg/L, 非必需氨基酸 10g/L)于 37°C 50mL/L CO₂饱和湿度培养箱中培养, 每 2~3d 换液传代 1 次, 取对数生长期细胞做实验。

1.2 方法

1.2.1 细胞增生的测定 人参皂苷 Rg3 粉剂由二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)助溶, 用完全培养基配制所需质量浓度(DMSO 溶度 < 1:1000)。将 SRA01/04 细胞以 2×10^7 /L 的密度种植于 96 孔板, 每孔种植细胞悬液 200 μ L。实验组加入终质量浓度为 10, 20, 40, 80, 120, 160mg/L 的 Rg3, 对照组不加药。每个质量浓度及空白对照孔均设 3 个平行孔, 置 37°C 50mL/L CO₂饱和湿度培养箱中培养 12, 24, 48 和 72h, 加入 5g/L 的 MTT 每孔 20 μ L, 孵育 4 h 后用微量加样器吸除上清液, 加 DMSO 100 μ L, 置微量振荡器上振荡 10min, 以充分溶解结晶物。用培养基加 DMSO 调零, 酶标仪检测吸光度 A 值, 检测波长为 490nm。按如下公式计算: 细胞增生抑制率 = $(1 - \text{实验组} A / \text{对照组} A) \times 100\%$ 。

1.2.2 细胞凋亡的测定 取处于指数生长期的 SRA01/04, 加入适量 2.5g/L 胰酶消化, 用含 100mL/L 胎牛血清的 MEM 培养液配成悬液, 用血球细胞板计数, 配成 2×10^8 /L, 取放有盖玻片的 6 孔细胞培养板, 每孔加细胞悬液 3mL, 将细胞板放在 37°C 含 50mL/L CO₂的培养箱中分别孵育 24h 后取出。换入终质量浓度为 10, 20, 40, 80, 120 和 160mg/L 的 Rg3 培养液, 细胞继续培养 48h 后, 取出细胞培养板。取出载玻片, 加 1 滴混合荧光染色液: 100mg/L 吖啶橙(AO)和 100mg/L 溴化乙啶(EB)混匀, 压上爬满细胞的盖玻片, 染色后马上将各组细胞爬片置于荧光显微镜下观察其形态学变化, 并进行拍摄照片。结果评价: 活细胞, 核着绿色荧光, 且形态结构正常; 凋亡细胞, 核着黄色荧光或橘红色荧光, 形态呈固缩状、圆珠状或新月形。另取密度为 1×10^{12} /L 的 SRA01/04 细胞, 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 2mL, 以加入终质量浓度为 10, 20, 40, 80, 120 和 160mg/L 的 Rg3 为实验组, 每个质量浓度设 3 个复孔。常

规培养于 MEM 培养液的 SRA01/04 细胞为对照组。常规培养 48h 后, 分别收集细胞于离心管, 1000r/min 离心 5min, 用 PBS 洗 2 次, 700mL/L 乙醇固定 10min, 4°C 下过夜保存。常规碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪分析。

统计学分析: A 值及抑制率数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析, 对数据进行多个样品均数的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SRA01/04 细胞生长抑制率 将 A 值转化为生长抑制率后, 可见 10mg/L Rg3 组 12, 24, 48 和 72 h 抑制率分别为 4.5%, 19.6%, 32.8% 和 49.4%; 20mg/L Rg3 组 12, 24, 48 和 72h 抑制率分别为 7.0%, 21.6%, 38.1% 和 62.1%; 40mg/L Rg3 组 12, 24, 48, 72 h 抑制率分别为 15.1%, 33.6%, 47.8% 和 68.2%; 80mg/L Rg3 组 12, 24, 48 和 72 h 抑制率分别为 19.5%, 37.9%, 55.7% 和 70.3%; 120mg/L Rg3 组 12, 24, 48 和 72 h 抑制率分别为 32.9%, 50.4%, 68.0% 和 74.2%; 160mg/L Rg3 组 12, 24, 48 和 72 h 抑制率分别为 47.5%, 65.5%, 74.4% 和 78.6%。同一时间, 不同实验组的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$), 随质量浓度增加而增大。同一实验组, 不同时间的抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$), 随着时间的延长而增加。Rg3 对 SRA01/04 细胞的抑制随时间和剂量的增加而增加。

2.2 SRA01/04 细胞凋亡结果 AO/EB 双染荧光显微镜下, Rg3 作用 48h 后观察结果显示, 对照组细胞呈绿色荧光未见凋亡改变。实验组细胞呈现黄色荧光或橘红色荧光, 细胞核呈固缩状或圆珠状, 浓聚、偏位, 表现为明显凋亡现象(图 1)。流式细胞术结果显示, 经不同质量浓度 Rg3 作用 SRA01/04 细胞 48h 后, G₁ 期峰前出现显著的凋亡峰。凋亡率(%)随质量浓度(10, 20, 40, 80, 120, 160mg/L)增加而增高: 对照组为 $0.28\% \pm 0.01\%$; 10mg/L Rg3 组为 $2.77\% \pm 0.12\%$; 20mg/L Rg3 组为 $4.19\% \pm 1.92\%$; 40mg/L Rg3 组为 $14.62\% \pm 1.51\%$; 80mg/L Rg3 组为 $18.56\% \pm 1.24\%$; 120mg/L Rg3 组为 $23.44\% \pm 1.12\%$; 160mg/L Rg3 组为 $28.93\% \pm 1.11\%$ 。

3 讨论

清除晶状体上皮细胞(lens epithelial cell, LEC)是防止 PCO 发生的关键, 这有些类似肿瘤的治疗, 因此应用抗肿瘤药物抑制 LEC 的增殖是预防 PCO 的重要途径^[1]。在抗肿瘤药物防治 PCO 的研究中, 疗效较好的药物有丝裂霉素等^[2,3], 但是由于毒性较大而限制了临床的应用。因此从不良反应小的天然抗肿瘤药物中寻求能有效抑制

LEC 增殖的药物具有重要意义。Rg3 正是一种低毒的天然药物,多用于抗肿瘤,能显著抑制多种癌细胞侵袭和转移。国内外科学家对 Rg3 的抗癌活性进行了深入的研究,揭示了 Rg3 的抗癌机制,研究表明,Rg3 的作用靶点主要有肿瘤细胞、肿瘤相关基因及肿瘤新生血管。Rg3 对多种体外培养的人肿瘤细胞株具有抑制增殖和诱导凋亡的生物活性。Rg3 使某些肿瘤细胞的生长受到明显的抑制,S 期细胞数增加,G2/M 期细胞数减少,凋亡细胞数增加^[4]。此外,Rg3 可诱导视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞凋亡^[5];Rg3 可能通过抑制钙内流促进钾外流改变细胞膜电位、干扰视网膜色素上皮细胞代谢,对视网膜色素上皮细胞增殖具有剂量依赖和时间依赖方式的抑制作用^[6];Rg3 对大鼠角膜碱烧伤后 CNV 的生长也有明显抑制作用,其作用机制与抑制 VEGF 表达有关^[7]。

Rg3 对体外 LEC 细胞的作用尚未见相关报道。我们发现,Rg3 能显著地抑制 SRA01/04 细胞增生。Rg3 作用 48h 后,SRA01/04 细胞可见黄色荧光或橘红色荧光细胞,核呈固缩状或圆珠状,浓聚、偏位,表现为明显凋亡现象,表明 Rg3 诱导了 SRA01/04 细胞的凋亡。通过流式细胞学分析发现,一定质量浓度的人参皂苷 Rg3 (10 ~ 160mg/L) 对于体外培养的 LEC 细胞 SRA01/04 具有较强的诱导凋

亡的能力,48h 后 G₁ 期峰前出现凋亡所特有的凋亡峰(亚二倍体峰),其促进凋亡的能力具有质量浓度依赖性,为防治 PCO 的治疗提供了新的思路。

参考文献

- 1 Wang TT, Xu GX. Effect of cinobufacine on the expressions of bcl-2 mRNA and bax mRNA and the proliferation of lens epithelial cells. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2009;29(10):915-917
- 2 Fernandez V, Fragoso MA, Billotte C, et al. Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: experimental study of rabbit eyes. *J Cataract Refract Surg* 2004;30(12):2598-2605
- 3 Miyamoto T, Saika S. Topical exposure of mitomycin C reduces opacification of the residual anterior lenscapsule and lenticular regeneration after vitrectomy and lensectomy in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;42(4):327-331
- 4 陈迪,崔俊生,刘学峡,等. 20(S)-人参皂甙 Rg3 诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡的研究. *中国实验诊断学* 2008; 12(4): 463-466
- 5 谭艺兰,许雪亮. 人参皂甙 Rg3 诱导视网膜母细胞瘤 HXO-RB44 细胞凋亡. *眼科研究* 2007;25(9):674-676
- 6 于澎,明月,庞利民,等. 人参皂苷 Rg3 对培养人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用. *哈尔滨医科大学学报* 2003;37(2):153-165
- 7 杨艳,张明昌. 人参皂甙 Rg3 在大鼠角膜新生血管中的作用研究. *眼科研究* 2007;25(8):580-583