

· 实验肿瘤 ·

人参皂甙 Rg3 在小鼠肝癌淋巴结转移模型中诱导细胞凋亡的作用

刘基巍 赵翌 富力^① 鲁岐^① 吕申^② 李莹^② 燕秋^②
大连医科大学附属第一医院肿瘤科 (辽宁省大连市 116011)

摘要 目的: 观察人参皂甙 Rg3 对小鼠肝癌淋巴结转移模型中肿瘤细胞凋亡的诱导作用, 探讨人参皂甙 Rg3 抗肿瘤淋巴结转移的机制。**方法:** 建立小鼠肝癌淋巴结转移模型; 光镜和透射电镜下观察各组(Rg3 预防组、Rg3 治疗组、Rg3 与顺铂联合治疗组、顺铂治疗组及对照组)中原发瘤及转移瘤组织的形态学结构改变, 并通过流式细胞仪分析肿瘤细胞的凋亡。**结果:** Rg3 预防组及治疗组电镜下(5 份样品)可见较多细胞凋亡小体的形成(5/5, 4/5); 顺铂治疗组的形态改变以细胞破坏为主, 凋亡的细胞较少; 联合治疗组细胞的凋亡和坏死程度相当。流式细胞学检测分析结果为: Rg3 预防组、治疗组及联合治疗组均见细胞凋亡的特征峰(5/5), 而顺铂治疗组为 1/5, 对照组未见凋亡峰(0/5)。**结论:** 人参皂甙 Rg3 抗肿瘤细胞淋巴结转移的作用与诱导细胞凋亡有关。

关键词 人参皂甙 Rg3 肝癌 淋巴结转移 细胞凋亡
中图分类号: R73-35*4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8179(2004)19-1120-03

Role of Ginsenoside Rg3 in inducing Apoptosis of Tumor Cells in the Lymphatic Metastasis Mouse

Liu Ji-wei Zhao Yi Fu Li Lu Qi et al

Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical university, Dalian

Abstract Objective: To study the mechanism of Ginsenoside Rg3 in anti-lymphatic metastasis of hepatoma by the observation of the apoptosis effect which may be induced in mouse. **Methods:** The transplanted hepatoma models with lymphatic metastasis were set up, and the apoptosis of the primary and metastatic tumors was analysed in the following five groups: Ginsenoside Rg3 pretreatment, Ginsenoside Rg3 treatment, combination of Ginsenoside Rg3 & cisplatin treatment, cisplatin treatment and control (saline) groups. **Results:** The morphologic change under the light and electric microscope showed that more apoptosis bodies appeared in Ginsenoside Rg3 pretreatment and Ginsenoside Rg3 treatment groups compared with those of the other groups (5/5, 4/5); The extent of cell necrosis in cisplatin treatment group was more obvious; while the apoptosis and cell necrosis presenting in combination group in between. Apoptosis peak was observed by FCM and apoptosis nodule was detected in Ginsenoside Rg3-treated groups; The main change in the control group was cell injury, and no apoptosis peak detected. **Conclusion:** Apoptosis is one of the mechanisms of Ginsenoside Rg3 in volving its the anti-lymphatic metastasis effect.

Key words Ginsenoside Rg3 Hepatoma Lymphatic Metastasis Apoptosis

① 大连富生天然药物研究所 ② 大连医科大学基础医学院

人参皂甙 Rg3(简称 Rg3)是从红参中微量提取的人参皂甙的一种化学成分,研究表明,Rg3 对血行转移的肿瘤细胞的增殖、浸润及转移等具有抑制作用^[1-6],推测其可能与诱导肿瘤细胞的凋亡有关。淋巴结转移是肿瘤转移的另一重要途径,由于高特异的淋巴结转移实验动物模型不易获得,因此,此方面的研究和报道较少。本研究利用具有高转移潜能的肝癌瘤株 Hca-F₂₅//6A₃-F(F),建立了特异性高、稳定性好的小鼠淋巴结转移模型,并在已经观察到了 Rg3 对原发瘤和转移瘤的抑制作用的前期工作基础上,研究 Rg3 的抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞的凋亡的相关性,以进一步探讨 Rg3 抗肿瘤作用机制。

1 材料及方法

1.1 实验材料

615 近交系小鼠,体重 22~24g,雌雄兼有。小鼠肝癌高淋巴结转移 Hca-F₂₅//6A₃-F(F)瘤株由大连医科大学病理教研室建株并提供。Rg3 纯品由大连富生天然药物研究所提供。

1.2 动物模型建立

将肝癌细胞 0.2ml (细胞存活率>95%,浓度为 2×10⁶ 个/ml)注射到小鼠腹腔内。收集腹水细胞,检测细胞存活率和调整细胞浓度(2×10⁶ 个/ml)后,取 0.2ml 接种于小鼠的右足垫。

1.3 实验分组及处理

实验分为 5 个组:Rg3 预防组(15 只);Rg3 治疗组(13 只);Rg3 与顺铂联合组(15 只);顺铂治疗组(14 只);对照组(生理盐水,14 只)。Rg3 经灌胃给药(0.1ml/只,3mg/kg·d);顺铂按 1mg/kg·d 经腹腔注射给药。除 Rg3 预防组于接种肿瘤前 7 天开始给药外,其余各组均于接种当日起连续给药 24 天。于第 25 天处死小鼠,取原发瘤及右膈窝、腹股沟处的淋巴结组织。

1.4 光镜和电镜观察及流式细胞仪检测

瘤组织常规进行组织固定、切片及染色,并在光镜和电镜下观察细胞坏死和细胞凋亡的形态学变化;将待进行流式细胞学分析的原发瘤和转移瘤组织(每个实验组随机选择 5 个配对样品)研磨后,过滤,滤液 37℃培养 1h,乙醇固定 24h 后,用于流式细胞仪(DD-B 公司,USA)检测。

1.5 观察指标

1)淋巴结转移抑制率的计算根据光镜下 HE 切片中转移淋巴结的计数,淋巴结转移抑制率=(同组小鼠数-同组淋巴结转移小鼠数/同组小鼠数)×100%;淋巴结转移程度分为 4 度:Ⅰ:转移瘤局限于边缘窦,<总面积的 1/3;Ⅱ:转移瘤>总面积的 1/3,<1/2;Ⅲ:转移瘤>总面积的 2/3;Ⅳ有被膜外侵犯。

2)流式细胞仪检测各组凋亡峰比率。

2 结果

2.1 淋巴结抑制率及转移程度

对照组可见大量的瘤细胞,淋巴结窦内有瘤细胞侵入的增多,有些瘤细胞向纤维组织浸润,肿瘤细胞呈多核分裂相;其它 4 组淋巴结转移均减少,淋巴结的结构多清晰可见(表 1,图 1)。

2.2 原发瘤和转移瘤组织的光镜和电镜分析

各组中经 HE 染色后在光镜下选择有明确转移的淋巴结组织块,制备透射电镜超薄切片样品并进行分析。结果显示:Rg3 预防组及治疗组在多个视野下可见染色质固缩,并向核周集聚,形成典型的细胞凋亡小体。同时,可观察到部分细胞内有线粒体结构的改变,如线粒体皱缩等;顺铂治疗组的细胞形态改变以细胞破坏为主,染色质向核中间集聚,肿胀的线粒体较多,偶见细胞凋亡小体;Rg3 与顺铂联合治疗组的细胞则出现细胞内的染色质既有向中间集聚的,也有向核周集聚的;阴性对照组含有较多细胞核增大的肿瘤细胞,基质弥散,偶见细胞凋亡小体(图 2)。

表 1 淋巴结抑制率及转移程度的比较 枚

分组	动物数 (只)	淋巴结 转移数	淋巴结转移 抑制率%	淋巴结转移程度			
				Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
Rg3 预防组	15	6	60.00	2	3	0	1
Rg3 治疗组	13	6	53.85	2	2	1	1
联合治疗组	15	4	73.33	2	1	1	0
顺铂治疗组	14	5	64.29	2	2	0	1
对照组	14	9	33.71	3	4	1	1

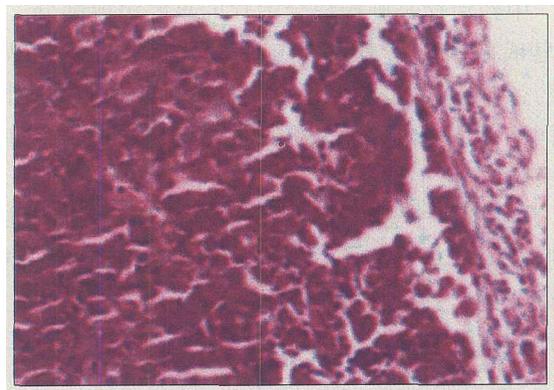


图 1 淋巴结中转移瘤细胞的浸润 HE×200

2.3 流式细胞学分析

Rg3 预防组、Rg3 治疗组、联合治疗组在 5 份样品中均可见特征性的细胞凋亡峰(5/5),顺铂治疗组仅有 1 份样品出现细胞凋亡峰(1/5),阴性对照组未见细胞凋亡峰(0/5)。Rg3 抗肿瘤生长主要作用于细胞 G₂ 和 S 期(图 3)。

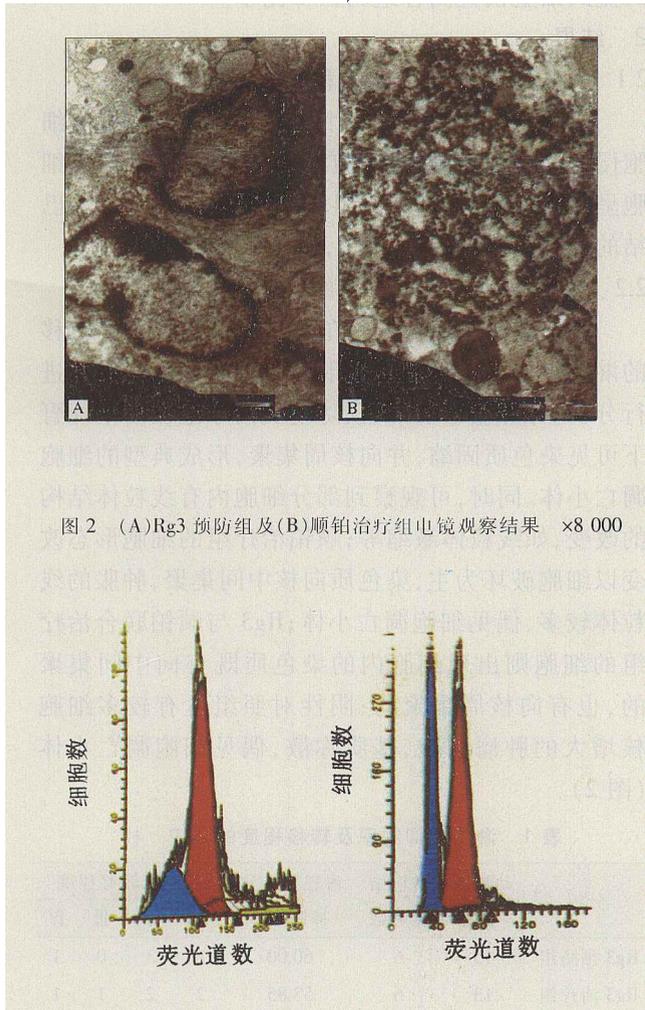


图2 (A)Rg3 预防组及(B)顺铂治疗组电镜观察结果 ×8 000

A:Rg3 治疗组(原发瘤) B:Rg3 治疗组(转移瘤)

图3 流式细胞学分析

3 讨论

中药治疗是肿瘤综合治疗的重要组成部分。人参皂甙 Rg3 是具有我国自主知识产权的中药单体新药,它可通过多种分子机制抑制肿瘤细胞的生长、浸润和转移, 研究和分析其抗肿瘤作用机制有重要意义。

细胞凋亡是指细胞的程序化死亡, 是机体维持细胞结构、功能正常及细胞数量动态平衡的一种重要调节机制; 而肿瘤细胞的异常变化之一是凋亡的肿瘤细胞数量降低。判断细胞发生凋亡的形态学特征为:染色质固缩,向核周移动,核膜崩溃及形成凋亡小体等^[7]。近年来的研究表明^[8-10],凋亡细胞在被诱导产生特征性 DNA 降解和形态学改变之前,有一个不可逆的线粒体膜结构和功能改变,包括线粒体皱缩、内膜跨膜电位消失、通透性转换(Permeability Transition,PT) 孔打开和线粒体内活性蛋白酶产物释放等。本实验所用的 Hca-F25//6A3-F(F)肝癌瘤

株,对淋巴管有极强的粘附力,无论经腋窝下、足垫,还是经血道接种于 615 近交系小鼠, 均可特异的向淋巴结转移,而向血道转移的可能性小、且出现晚。因此, 本实验中采用足垫接种方法建立实验动物模型,是研究肿瘤淋巴结转移行为的较理想的模型^[11,12]。本结果显示,Rg3 预防组、Rg3 治疗组及联合治疗组中,可抑制淋巴结转移,并发生凋亡的肿瘤细胞数目明显增多,说明人参皂甙 Rg3 具有诱导小鼠肝癌细胞凋亡的作用。在原发瘤及转移瘤中均观察到细胞凋亡的形态学变化并检测到细胞凋亡峰,提示人参皂甙 Rg3 对肿瘤发生不同阶段的细胞凋亡有促进作用,其抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡具有相关性,这对肿瘤的复发和转移的治疗有积极的意义。

参考文献

- 1 高船舟,曲淑贤,吕广艳,等.20(R)-人参皂甙 Rg3 对 K562/ADM 细胞凋亡诱导作用的研究[J].大连医科大学学报,2001,23(3):171~173
- 2 陈大富,赵扬冰,白绍槐,等.人参皂甙 Rg3 对乳腺浸润性导管癌的抗癌作用及其机制[J].四川大学学报,2003,34(3):546~548
- 3 寒川庆一,山下秀之,松田秀秋,等.高速液体クロマトグラフィーによる各種薬用人参中サポニコの一斉分析 [J]. 药学杂志, 1995,115(3):241~249
- 4 Kitagaawa I, Akedo H, Shinkai K, et al. Inhibition of tumor cell invasion and metastasis by ginsenoside Rg3[J]. Ginseng Rev, 1995, 16(1): 16~20
- 5 Shinkai K, Akedo H, Mukai M, et al. Inhibition of in vitro tumor cell invasion by ginsenoside Rg3 [J].Jpn J Cancer Res, 1996, 87(4): 357~362
- 6 赵 翌,刘基巍.20(R)-人参皂甙 Rg3 抗肿瘤作用的研究进展[J].临床肿瘤学,2001,6(1):81~82
- 7 彭黎明,王曾礼,主编.细胞凋亡的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2000.1~28
- 8 Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy [J]. Cancer, 1994, 73 (8): 2013~2026
- 9 Venerando R, Miotto G,Pizzo P, et al. Mitochondrial alterations induced by aspirin in rat hepatocytes expressing mitochondrially targeted green fluorescent protein (mtGFP)[J]. FEBS Lett, 1996, 382(3): 256~260
- 10 朱海青,王振义.线粒体在细胞凋亡中的作用[J].国外医学分子生物学分册,2000,22(1):27~30
- 11 凌茂英,刘希风,关素琴,等.小鼠肝癌为同转移力克隆的分离及其特性的研究[J].中华医学杂志,1990,70(6):315~318
- 12 侯 力,凌茂英,吕 申,等.两株不同转移能力小鼠肝癌细胞对宿主淋巴系统的影响[J].实用肿瘤杂志,2000,15(2):90~92

(2004-04-15 收稿)

(2004-08-02 修回)

(董恒磊校对)