

论 著

(基础研究)

人参皂甙 Rh2 对人胶质瘤细胞内钙离子浓度的影响

吴章泽, 王一芳, 王正伟, 陈 昌

【摘要】 目的 观察人参皂甙 Rh2 对人胶质瘤细胞内钙离子浓度的影响。方法 实验分为对照组和人参皂甙 Rh2 组, 对照组应用常规培养基培养人胶质瘤细胞株 U87MG, 人参皂甙 Rh2 组在常规培养基中人参皂甙 Rh2 的浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$, 利用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪检测各组培养的人胶质瘤细胞内钙离子浓度, 再利用 Western blot 技术检测人胶质瘤细胞 Cav1.2 蛋白的表达, 最后利用膜片钳技术检测人胶质瘤细胞 L 型电压依赖性钙离子通道的功能。结果 人参皂甙 Rh2 处理 U87MG 细胞后, 细胞内钙离子浓度是对照组的 2.5 倍 ($P < 0.05$); 人参皂甙 Rh2 培养后胶质瘤细胞 Cav1.2 蛋白表达量是对照组的 1.5 倍 ($P < 0.05$), 且 L 型电压依赖性钙离子通道功能增强。结论 人参皂甙 Rh2 可通过增加胶质瘤细胞 Cav1.2 表达和 L 型电压依赖性钙离子通道的功能促进细胞内游离钙离子浓度的增加, 从而诱导人胶质瘤细胞的凋亡。

【关键词】 人参皂甙 Rh2; 人胶质瘤细胞; 细胞内钙离子浓度; L 型电压依赖性钙离子通道; Cav1.2

【中图分类号】 R34

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2019)01-0012-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.01.003

Research on the effect of ginsenoside Rh2 on intracellular calcium concentration of human brain glioma cells

WU Zhang-ze, WANG Yi-fang, WANG Zheng-wei, CHEN Chang

(Department of Neurology, Air Force Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rh2 on intracellular calcium concentration of human brain glioma cells and its mechanism. **Methods** Human U87MG brain glioma cells were cultured in conventional medium (control group) and in conventional medium with 20 $\mu\text{g/mL}$ ginsenoside Rh2 (experimental group). We tested the intracellular calcium concentration of human brain glioma cells by laser scanning confocal microscope and flow cytometry. The expression of Cav1.2 was measured by the Western blotting. And the function of L-type calcium channel was measured by patch clamp. **Results** The treatment of ginsenoside Rh2 increased the intracellular calcium concentration of human brain glioma cells, promoted the expression of Cav1.2 and facilitated the function of L-type calcium channel. **Conclusion** Ginsenoside Rh2 increases the intracellular calcium concentration of human brain glioma cells by promoting the expression of Cav1.2 and facilitating the function of L-type calcium channel.

【Key words】 ginsenoside Rh2; human brain glioma cells; intracellular calcium concentration; L-type calcium channel; Cav1.2

0 引言

脑胶质瘤是中枢神经系统中发病率最高的恶性肿瘤^[1-2]。由于其生长呈浸润性且与周围正常组织分界不清,即使是当代的神经外科技术操作也难以做到将肿瘤在病理学上完全切除,因而胶质瘤的

复发率极高,且胶质瘤随着复发次数的增加,其恶性程度亦增加^[3-4]。因此,研究脑胶质瘤的分子机制、发现治疗的新型药物有重要意义。大量研究表明,作为细胞内第二信使的钙离子在细胞的增殖、凋亡等过程中发挥重要作用,而 L 型电压依赖性钙离子通道(L-type voltage dependent calcium channel, LTCC)是钙离子进入胶质瘤细胞的主要方式^[5-6]。人参皂甙 Rh2 是人参中的天然成分,其具有脂溶性,极易通过血脑屏障^[7-8]。本研究通过人参皂甙

作者单位:210002 南京,东部战区空军医院神经内科(吴章泽、王一芳、王正伟、陈 昌)

通信作者:王一芳, E-mail:523010450@qq.com

Rh2 体外培养的人胶质瘤细胞,利用流式细胞仪等手段检测细胞内钙离子浓度,进而探究其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 细胞培养基、胎牛血清等细胞培养试剂(Gibco 公司);人胶质瘤细胞株 U87MG(中科院上海细胞库);膜片钳信号采集设备(Nihon Kohden, CEZ-2300);人参皂甙 Rh2(南京世洲生物科技有限公司);激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5);流式细胞仪(美国 B&D 公司);尼非地平、Bay K8644 和 Cav1.2 抗体(以色列 Alomone 公司);荧光标记钙离子探针 Fluo-3AM(中国碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞的培养环境为 37℃,5%CO₂ 孵箱内培养。取第 5~10 代 U87MG 细胞株用于实验。实验分为对照组和人参皂甙 Rh2 组,对照组应用常规培养基培养细胞,人参皂甙 Rh2 组在常规培养基中人参皂甙 Rh2 的浓度为 20 μg/mL,作用时间为 48 h。

1.2.2 钙显像检测 U87MG 细胞内钙离子浓度 利用 Fluo-3AM 对 U87MG 细胞内游离钙离子标记, PBS 洗涤细胞,37℃孵箱孵育 30 min,再次用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,参照说明设置激光共聚焦显微镜参数。在共聚焦显微镜视野中选取 50 个细胞并检测细胞内的荧光强度,并利用激光共聚焦显微镜自带软件进行数据分析。

1.2.3 流式细胞仪检测 U87MG 细胞内钙离子浓度 将 U87MG 细胞制备成流式细胞仪合适的细胞悬液,利用上述方法标记 U87MG 细胞内钙离子,调节细胞数量至 2×10^6 /mL,上流式细胞仪检测。激发条件为:发射波长为 525 nm,激发波长为 488 nm。利用 EXPO32 和 FACSDiva 软件对检测数据进行分析。

1.2.4 Western blot 检测 U87MG 细胞 Cav1.2 含量 LTCC 是钙离子进入 U87MG 细胞的主要通道。为了探究人参皂甙 Rh2 增加 U87MG 细胞内钙离子的原因,利用 Western blot 技术检测 U87MG 细胞膜上 LTCC 核心蛋白 Cav1.2 表达。制备 U87MG 细胞的蛋白样本,并绘制标准曲线;将上述成功制备的蛋白样本煮沸后电泳,条件设置为 90 V,持续 30 min,随即更改电泳条件为 120 V,继续电泳 90 min;

转膜时设置条件 250 mA 恒流 2 h;按照抗体说明书孵育一抗 4℃过夜,孵育二抗后进行 ECL 发光进行半定量分析。

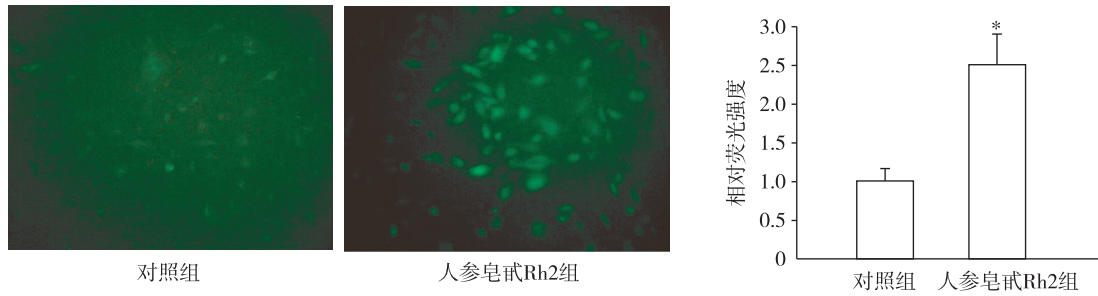
1.2.5 膜片钳全细胞模式记录 U87MG 细胞 L 型电压依赖型钙离子通道电活动 为了进一步探究人参皂甙 Rh2 增加 U87MG 细胞内钙离子浓度的原因,我们利用膜片钳技术检测人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞上 LTCC 功能的影响。利用垂直拉制法制备接触细胞用玻璃微电极,根据 U87MG 细胞内液的成分和 L 型电压依赖型钙离子通道的特性,配制玻璃微电极内外液体,电极内液配方为 (mmol/L) 150 CsCl、10 HEPES、5 Na₂ATP、5 EGTA 和 10 D-葡萄糖, pH 用 CsOH 调整到 7.2;制备外液 1 和外液 2,其配方分别是外液 1 (mmol/L):120 NaCl、0.1% BSA、30 mannitol、30 HEPES、3 K₂HPO₄、0.5% 葡萄糖和 1 MgSO₄,用 NaOH 将 pH 调整至 7.4;外液 2 (mmol/L):10 HEPES 和 108 BaCl₂,用 Ba(OH)₂ 将 pH 调整到 7.6。高阻封接后保持电阻在 2 GΩ 以上,随后进行电击或者吸引破膜。先利用 LTCC 特异的激动剂(Bay K8644)和阻断剂(尼非地平)处理后检测单个细胞的电流水平,明确上述方法检测到的电流为 LTCC 产生的电流。进一步再检测 2 组多个细胞的电流强度变化。

1.3 统计学分析 利用 SPSS 16.0 统计软件进行相关数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,首先进行数据正态性分析和方差齐性的检验,两样本间比较采用独立 *t* 检验;不同时间点多次测量的样本分析采用重复测量方差分析,组间比较采用 Bonferroni post hoc 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

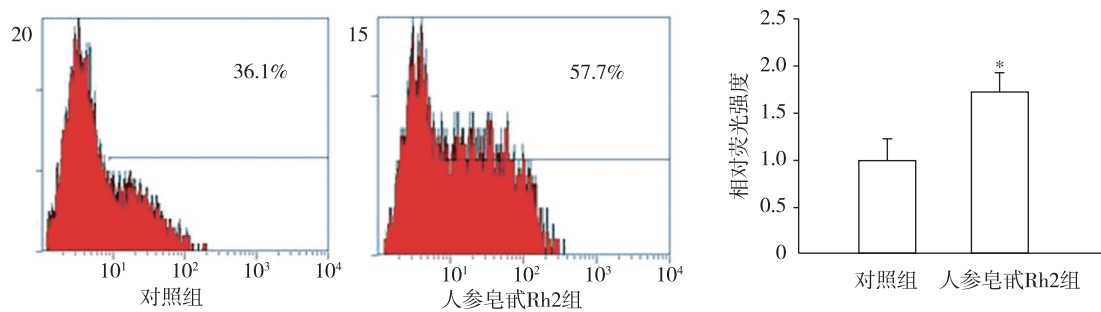
2.1 钙显像技术和流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度 与对照组比较,人参皂甙 Rh2 组荧光强度明显增高。人参皂甙 Rh2 处理后 U87MG 细胞内钙离子浓度是对照组 U87MG 的 2.6 倍($P < 0.05$),见图 1。流式细胞仪结果显示:与对照组比较,人参皂甙 Rh2 组荧光强度明显增高($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 Western blot 检测细胞 L 型钙离子通道的核心蛋白 Cav1.2 的表达量 Western blot 结果显示:人参皂甙 Rh2 能够上调 Cav1.2 的蛋白表达($P < 0.05$),见图 3。



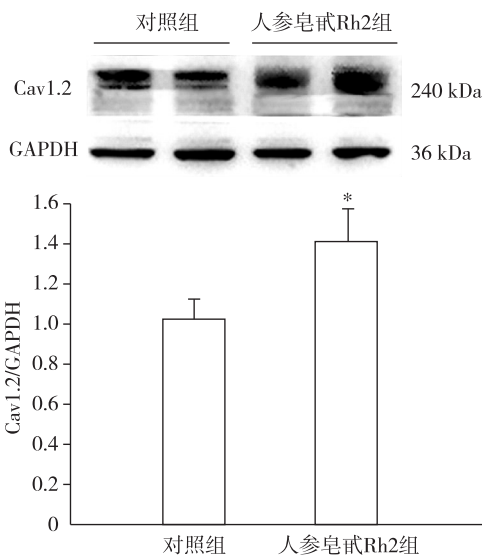
与对照组比较, * $P < 0.05$

图 1 钙显像技术检测 U87MG 细胞内钙离子浓度



与对照组比较, * $P < 0.05$

图 2 流式细胞仪检测 U87MG 细胞内钙离子浓度



与对照组比较, * $P < 0.05$

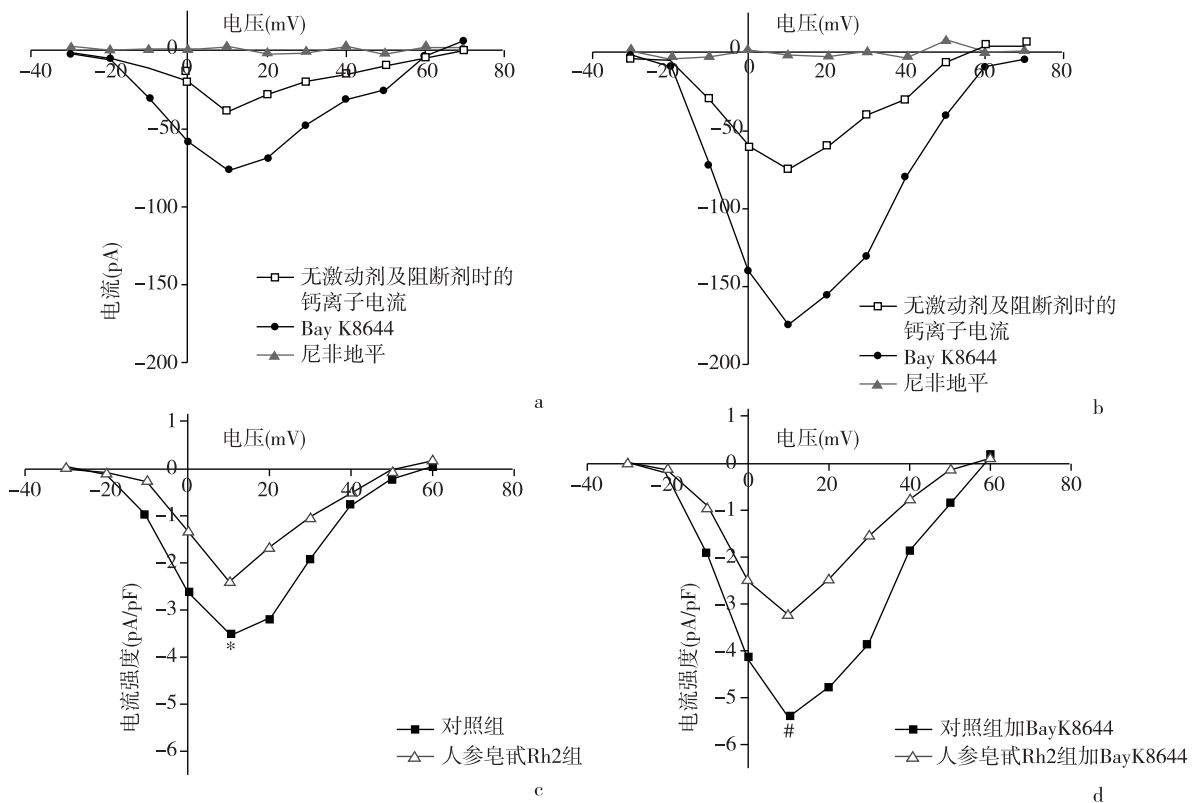
图 3 Western blot 检测各组细胞中 L 型钙离子通道的核心蛋白 Cav1.2 的表达量

2.3 膜片钳检测细胞 LTCC 电流强度 人参皂甙 Rh2 处理后 U87MG 细胞上 LTCC 电流增强 ($P < 0.05$), 且在加入此离子通道特异性激动剂 Bay K8644 后人参皂甙 Rh2 组和对照组的钙离子电流强

度均增加, 但人参皂甙 Rh2 组钙离子电流强度增加的幅度更大 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨 论

虽然目前胶质瘤的治疗是积极的手术、放、化疗等联合措施, 但胶质瘤复发率极高, 且随着复发次数的增加, 其恶性程度亦增加, 患者预后极差。研究表明, WHO 分级 3 级的胶质瘤患者的平均生存期在 4 年左右, 恶性程度较高的胶质母细胞瘤患者平均生存期为 12~15 个月。因此, 寻找胶质瘤治疗新靶点具有重要意义^[9-11]。人参皂甙 Rh2 相对分子质量小, 且为脂溶性容易通过血脑屏障在颅内发挥作用^[7-8]。有研究表明人参皂甙 Rh2 可通过激活 Caspase 通路促进肝细胞的凋亡, 并伴有细胞周期的改变^[12]。研究证实人参皂甙 Rh2 抑制 C6 胶质瘤细胞的增殖并可诱导胶质细胞瘤的凋亡^[7]。作为细胞内第二信使的钙离子在细胞的增殖、凋亡等过程中发挥重要作用^[13]。而细胞内过多的钙离子引起钙超载, 后者又是引起细胞凋亡的重要机制。



a:对照组;b:人参皂甙 Rh2 组;c:无钙离子通道调节剂作用;d:L 型钙离子通道特异性激动剂作用
与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$

图 4 膜片钳全通道技术检测细胞 L 型电压依赖性钙离子通道电流强度

本实验中,我们利用 Fluo-3AM 标记 U87MG 细胞内钙离子,分别利用流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测 U87MG 细胞内钙离子浓度,我们发现人参皂甙 Rh2 处理后,U87MG 细胞内钙离子浓度增加。研究证实大多数细胞内游离钙离子有两个来源,即外钙内流和内钙释放,前者主要是指细胞外的钙离子通过钙离子通道进入细胞内,而细胞表面的钙离子通道主要指的是 LTCC^[6];后者主要是指细胞内部内质网等细胞器的释放,但细胞器中钙离子的释放主要是通过细胞器表面 Ry 受体等形式释放,可使得细胞内的钙离子在短时间内大幅提升^[14-15]。而本实验中,U87MG 细胞内的钙离子浓度持续保持较高水平,未检测到短时间内大幅度的细胞内钙离子浓度波动,故我们将 LTCC 作为机制探究的重点。

为了进一步探究人参皂甙 Rh2 增加 U87MG 细胞内钙离子浓度的原因,我们围绕 U87MG 细胞 LTCC 分别利用免疫印迹技术和膜片钳技术检测 LTCC 相关特性,发现 U87MG 细胞上 LTCC 的核心

蛋白 Cav1.2 表达增加,且 LTCC 在人参皂甙 Rh2 处理后功能增强。LTCC 的功能受到多种因素的影响,主要包括通道的数量和单个通道的功能^[12],本实验中 Cav1.2 表达增加可能是 LTCC 功能增强的原因之一。通过本实验我们认为,细胞外游离钙离子通过 LTCC 进入细胞很可能是人参皂甙 Rh2 处理后 U87MG 细胞内钙离子浓度增加的一个重要原因。

综上所述,人参皂甙 Rh2 可通过增加 U87MG 细胞通道核心蛋白 Cav1.2 表达和 LTCC 的功能促进细胞内游离钙离子浓度的增加。本实验探讨了人参皂甙 Rh2 对 U87MG 细胞内游离钙离子浓度的影响及其可能的机制,但人参皂甙 Rh2 促进 U87MG 细胞内游离钙离子浓度升高的原因和人参皂甙 Rh2 诱导 U87MG 细胞凋亡的其他机制仍有待进一步研究与探索。

[参考文献]

- [1] Jue TR, Sena ES, Macleod MR, et al. A systematic review and meta-analysis of topoisomerase inhibition in pre-clinical glioma models[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(13): 11387-11401.

- [2] Tsybal DO, Minchenko DO, Kryvdiuk IV, *et al.* Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation [J]. *Fiziol Zh*, 2016, 62(1): 3-15.
- [3] 程光, 章翔, 鲍炜, 等. RNA 干扰基因敲除 MAGE-1 在恶性胶质瘤 U87 细胞中的初步研究[J]. *医学研究生学报*, 2006, 4(2): 292-297.
- [4] 吴彩云, 张春妮. MicroRNA 与神经胶质瘤关系的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2014, 7(3): 746-750.
- [5] Moschovos C, Papatheodoropoulos C. The L-type voltage-dependent calcium channel long-term potentiation is higher in the dorsal compared with the ventral associational/commissural CA3 hippocampal synapses[J]. *Neurosci Res*, 2016, 106(2): 62-65.
- [6] Sun Z, Cao X, Zhang Z, *et al.* Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by the up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(3): 8077.
- [7] 姚兴军, 洪新雨, 刘兴吉, 等. 人参皂甙 Rh2 对脑胶质细胞瘤侵袭性的影响[J]. *中国实验诊断学*, 2005, 21(6): 36-39.
- [8] 权恺, 刘群, 李萍, 等. 人参皂苷抗癌活性的最新研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2015, 4(7): 427-431.
- [9] Shen F, Guo Q, Hu Q, *et al.* RelB, a good prognosis predictor, links cell-cycle and migration to glioma tumorigenesis[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 4404-4410.
- [10] Thust SC, Heiland S, Falini A, *et al.* Glioma imaging in Europe: A survey of 220 centres and recommendations for best clinical practice[J]. *Eur Radiol*, 2018, 28(8): 3306-3317.
- [11] 江山, 陈莺, 房德芳. 人参皂甙 Rh2 抗海马脑片 H₂O₂ 损伤作用及与 GABAA 受体的关系[J]. *中药药理与临床*, 2016, 6(2): 38-42.
- [12] Park JA, Kim KW, Kim SI. Caspase specifically cleaves p21 WAF1/CIP1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 257(1): 242.
- [13] Zhu P, Hu S, Jin Q, *et al.* Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway[J]. *Redox Biol*, 2018, 16(9): 157-168.
- [14] Santulli G, Lewis D, des Georges A, *et al.* Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease [J]. *Subcell Biochem*, 2018, 87(4): 329-352.
- [15] Kolb I, Stoy WA, Rousseau EB. Cleaning patch-clamp pipettes for immediate reuse[J]. *Sci Rep*, 2016, 11(3): 35001.

(收稿日期: 2018-03-16; 修回日期: 2018-12-09)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)