

Ginsenoside Rg3 Increases the Sensitivity of Ovarian Cancer Cells to Cisplatin and Its Mechanism

Yan Sang¹, Qin Zheng^{1*}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Affiliated Hospital, Jiangsu, Nanjing 210000

Email: 1465100070@qq.com

Abstract

To investigate the effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on proliferation and cisplatin sensitization of ovarian cancer cells SKOV3. **Methods:** The cell activity of ginsenoside Rg3 and cisplatin on ovarian cancer cells was measured by CCK-8 method. Cell morphology was observed by inverted microscope. Cell migration was investigated by scratch test. To investigate the effect of ginsenoside Rg3 on the cloning ability of SKOV3 cells. Western blot assay was used to investigate the effect of ginsenoside Rg3 on the expression level of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in SKOV3 cells. **Results:** Ginsenoside Rg3 inhibited SKOV3 cells in a time-dependent and dose-dependent manner. Ginsenoside Rg3 increased SKOV3 cells' sensitivity to cisplatin. When the cells were examined under microscope, it was found that compared with DDP alone, the cells became round and apoptotic cells increased. The clonal formation data showed that with the increase of cisplatin concentration, the number of clonal formation of SKOV3 cells was significantly reduced, and the addition of ginsenoside Rg3 could further inhibit the formation. Scratch experiments showed that ginsenoside Rg3 could further inhibit the migration of ovarian cancer cells under DDP. Western blot analysis showed that ginsenoside Rg3 could reduce the protein expression level of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Conclusion:** Ginsenoside Rg3 can control the proliferation and progression of SKOV3 cells, promote cell sensitivity to cisplatin, inhibit the expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, and increase the sensitivity to cisplatin by inhibiting the expression of this signaling pathway.

Keywords: Ovarian Cancer; Cisplatin; Ginsenoside Rg3; PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

人参皂苷 Rg3 增加卵巢癌细胞对顺铂敏感性及其机制研究

桑燕¹, 郑勤^{1*}

1. 南京中医药大学 附属南京医院, 江苏 南京 210000

摘要: 目的: 探究人参皂苷 Rg3 对卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖及顺铂增敏功能的效果及其作用机制。方法: CCK-8 法测人参皂苷 Rg3 和顺铂对卵巢癌细胞的细胞活性; 倒置显微镜观察细胞形态; 划痕实验探究细胞迁移; 克隆形成实验探讨人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞克隆产生能力的作用; Western blot 实验探讨人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路表达水平的效力。结果: 人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞呈时间和剂量依赖性抑制, 人参皂苷 Rg3 可增加 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性。在镜下查看细胞, 结果发现和单一使用 DDP 相比, 加药后细胞变圆, 凋亡细胞增多。克隆形成数据得出, 顺铂的浓度抬升, SKOV3 细胞的克隆形成数量显著削减, 加入人参皂苷 Rg3 能进一步抑制; 划痕实验实验结果可以显示, 人参皂苷 Rg3 能够进一步抑制 DDP 作用下的卵巢癌细胞的迁移效果。Western blot 探究数据看出, 人参皂苷 Rg3 可使 PI3K/Akt/mTOR 信号通路蛋白表达量降低。结论: 人参皂苷 Rg3 可控制 SKOV3 细胞的增殖和进展, 可

以促进细胞对顺铂的敏感性，对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路表达具有抑制效果，并通过抑制该信号通路表达增加对顺铂的敏感性。

关键词：卵巢癌；顺铂；人参皂苷 Rg3；PI3K/Akt/mTOR 信号通路

引言

在所有的肿瘤类型中，卵巢癌是非常容易见到的肿瘤，这类肿瘤经常会被人们忽视，因为它在发病初期的病症并不是特别明显，日积月累之下很多病人发现病症之时已经为时晚矣^{[1]-[4]}，目前的医疗技术已经对此时的病情几乎无能为力，卵巢癌也成了飘在女性健康之上的一朵乌云。目前的诊治技术对于此类癌症的疗养手段主要是外科切除或通过化学药物治疗^[5]，不过随着使用周期的不断拉长，药物也逐渐会产生耐药性^[6]，探索新的治疗卵巢癌的化合物就非常的重要。而我们中国传统中医药就是一个巨大的宝库，许多的中成药都可以在治疗疾病的同时增强免疫力，副作用也不会过于的强烈，安全性较高^[7]。在临床当中，许多的中成药以及复方制剂在肿瘤治疗的范畴当中也颇有功效。而中药单体是中药现代化研究重要的基础。目前许多的探讨指出^[8]，中药单体人参皂苷 Rg3 对于许多的瘤种有调节效力。本研究主要讨论人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞的增殖抑制及克隆形成的影响，并对其中的机制进行讨论。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

移液器 (Thermo 公司)；-80℃ 冰箱 (BIOBASE 公司)；水浴锅 (BIOBASE 公司)；电泳仪 (BIOBASE 公司)；生物安全柜 (BIOBASE 公司)；37℃ 恒温水浴箱 (上海尚仪有限公司)；电子天平 (上海天平仪器厂)；酶标仪 (BIOBASE 公司)；倒置显微镜 (上海尚仪有限公司)。

DMEM 培养基 (凯基生物科技有限公司)；顺铂 (上海源叶生物科技有限公司)；人参皂苷 Rg3 (上海源叶生物科技有限公司)；CCK8 试剂盒 (广州小凡科技有限公司)；RIPA 组织细胞快速裂解液 (广州小凡科技有限公司)；5*蛋白上样缓冲液 (北京索莱宝公司)；二抗 (广州小凡科技有限公司)；Akt 抗体 (上海碧云天)； β -Actin 兔单抗 (上海碧云天)；PI3K 抗体 (上海碧云天)；mTOR 抗体 (上海碧云天)。

1.2 细胞株

卵巢癌细胞株 SKOV3 购于深圳市科普生物有限公司。

1.3 细胞培养

在 37 摄氏度培养箱中培养 SKOV3 细胞，培养瓶灭菌确保干净后转移到超净台里面，打开盖子将原来培养基弃去，用 PBS 两毫升来洗涤细胞，添进胰酶一毫升，盖紧瓶盖，放入培养箱 2 分钟，确认细胞形态发生变化，就可添加配置好的培养基暂停试剂作用。把它转移到离心机中进行固液分离，设置好转速。离心好后倒出管中上层不要的液体，使用调配好的培养基重新制备含细胞液体，吸出添加到容器中，观察形态是否正常，转移到培养箱中继续孵育。

1.4 CCK-8 法测人参皂苷 Rg3 和顺铂单独及联合对卵巢癌细胞的细胞存活率

用 DMEM 完全培养基加 10% 胎牛血清和双抗制成培养基，用来培养 SKOV3 细胞，等待细胞长至 2 到 3 天增殖较快时，添加符合实验用量的胰酶改变细胞贴壁状态，放至孵育箱一段时间，取出添加配置好的培养基，重悬，吸取液体至离心管，放入离心机中固液分离。再取细胞孵育板，用 PBS 将每个孔润洗，将上述调整好浓度的含细胞培养基以每孔 200 微升加入，外圈添加相同体积的 PBS，防止边缘孔液体因温度较高蒸发。等待 24h 之后细胞附着在容器底部，转移出已没有营养的培养基，加入浓度为 40、80、160、320、640 μ g/mL 的含药培养基，每种实验浓度设置 5 个平行复孔，继续孵育 24 小时、48 小时、72 小时。培

养结束后转移出容器中的液体，实验孔添加 10:1 的含 CCK-8 的经过调配的培养基，转移实验板至培养箱几个小时。放置时间到后，将实验板放入酶标仪，波长设置为 450nm，精密量化并反映出每个实验孔的吸光度。根据 OD 值测算细胞存活率，细胞存活率=[(实验组-空白组)/(对照组-空白组)×100%]。运用 Origin 数据及图表分析软件分析数据，计算半数抑制浓度，并对结果进行分析。

1.5 倒置显微镜观察细胞形态

等待细胞长至 2 到 3 天增殖较快时，倒出原来容器中的液体，使用专用试剂洗涤几次后，添加符合实验用量的胰酶改变细胞贴壁状态，用配置好的培养基停止上述反应进程，用手持液体转移仪器转移该液体到离心管中，放入离心机中进行固液分离。取 6 孔板，每孔添加两毫升的含细胞培养液，转移至适宜条件中进行孵育 24h。设置对照组，DDP 低中高浓度组，人参皂苷 Rg3+DDP 组。24h 后，弃去培养容器中的液体，根据实验方案添加对应含有药物的培养基，进行下一步的孵育进程。时间到后取出板，拍下查看结果。

1.6 划痕实验探究人参皂苷 Rg3 和顺铂单独联合对划痕愈合率的影响

如果细胞增殖情况良好，添加符合实验用量的胰酶改变细胞贴壁状态，转移至离心管进行固液分离，离心好后添加符合实验用量的配置好的培养基，将细胞悬浮液调整至 $5 \times 10^3/\text{mL}$ ，接种于六孔板中。六孔板背面每隔 0.5 厘米划一条横线。实验分组分为对照组，DDP 组，人参皂苷 Rg3+顺铂组。培养 48h 后，确认细胞生长状态，若细胞长满，用装有 200 微升枪头的移液枪垂直于黑线纵向划线，划好后弃去容器中液体，用 PBS 清洗每孔，将漂浮在孔中的多余细胞清理出去，按上述分组往每孔添加含药培养基，用倒置显微镜拍下原始状态，继续培养 24h。到时间后，拍下结果，用 Image J 软件解析。

1.7 细胞克隆形成实验探究人参皂苷 Rg3 和顺铂对细胞克隆形成能力的作用

把细胞在培养基内的含量稀释至上述实验相同条件，取出 6 孔板，每孔加 1ml，为了防止细胞聚集在一个地方导致实验结果受影响，需要振动培养板使细胞分散开来。培养箱打开将实验用板放置进去，等待 24 小时时间到后，等细胞完全贴壁，倒出原来的容器中的液体，加入含药的培养基，每隔两天更换容器中的液体，培养结束后倒出原来的容器中的液体，用 PBS 清洗六孔板，重复上述实验操作几次，再使用无水甲醇让细胞固着在生长的地方，10 分钟后吸去甲醇，添加染色液进行染色 20 分钟，时间到后吸出液体用清洗两遍，等晾干之后对六孔板进行拍照，将拍照结果导入 Image J 软件中对细胞的克隆生成能力进行分析。

1.8 Western blot 法检测人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

培养 skov3 细胞调整细胞浓度并接种于 10cm 培养皿中，实验分为对照组，人参皂苷 Rg3 低中高给药组。药物作用于细胞后，吸出培养基，加入 PBS 清洗，清洗完后尽量吸出残余液体。培养皿放置冰上，RIPA 裂解 10min，提取蛋白，定量，并制作上样缓冲液和上样品。之后进行电泳，转膜，封闭，一抗孵育，二抗孵育，成像，用 ImageJ 进行结果分析。

1.9 统计学分析

本文实验所得数据，均由 SPSS 20.0 软件进行分析。采用 Origin 软件进行绘图。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法测人参皂苷 Rg3 和顺铂单独及联合对卵巢癌细胞的细胞存活率

为了探究人参皂苷 Rg3 和 DDP 对卵巢癌细胞的细胞存活率的作用，本课题选用了上皮性贴壁人卵巢癌细胞 SKOV3 来实验测试两种药物的效果。CCK-8 实验结果显示，人参皂苷 Rg3 在 40, 80, 160, 320, 640 μ

g/mL 对 SKOV3 细胞的抑制作用十分明显, 24h, 48h, 72h 的半数抑制浓度为 413.57 和 155.32 和 48.69, 逐渐降低, 呈时间和剂量依赖性抑制 SKOV3 细胞。见图 1。

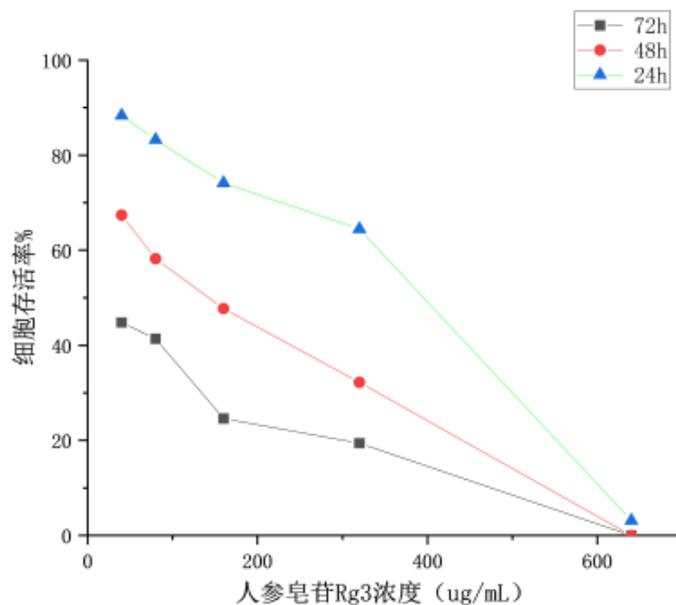


图 1 人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞存活率的影响

CCK-8 探究数据表明, 顺铂在 2, 4, 8, 16, 32 μ g/mL 对 SKOV3 细胞的抑制作用十分明显, 经计算 24h, 48h, 72h 的半数抑制浓度为 8.06 和 2.78 和 2.05, 顺铂呈时间和剂量性的抑制 SKOV3 细胞。见图 2。

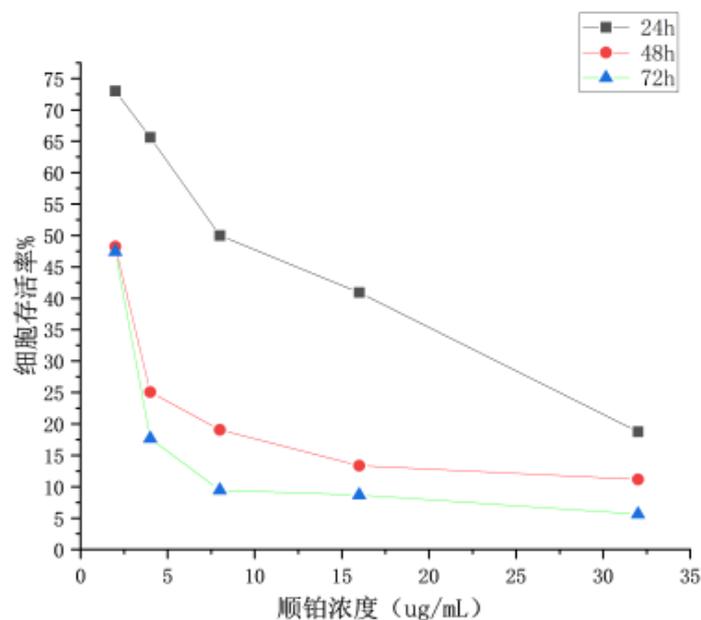


图 2 顺铂对 SKOV3 细胞存活率的影响

第一个实验求得人参皂苷 Rg3 的半数抑制浓度为 160 μ g/mL, 为减少细胞毒作用, 选取使用 80 μ g/mL 继续实验, 加入 80 μ g/mL 的人参皂苷 Rg3 后, 24h, 48h, 72h 的半数抑制浓度为 7.16 和 2.11 和 1.57, 均小于未加之前, 可见人参皂苷 Rg3 可增加 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性。见图 3。

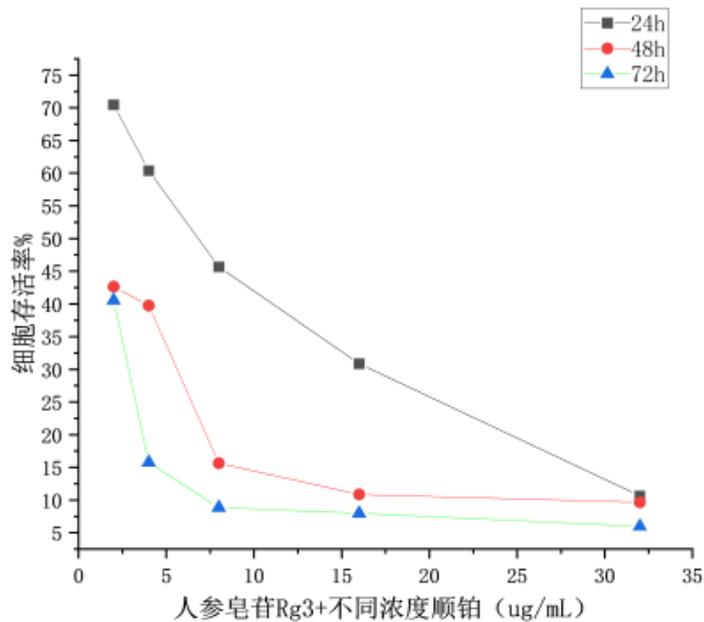


图 3 人参皂苷 Rg3 和顺铂联合对卵巢癌细胞的细胞存活率的影响

2.2 倒置显微镜观察细胞状态

肿瘤细胞的形态多种多样，它们的形态也在一定程度上反应了其相应的生物学表现，当肿瘤形态较为规整圆润时，它们的恶性生物学行为较为轻微，相比于呈现出有伪足且梭状拉伸形态的细胞。以下是加药后呈现出形态及活细胞数目变化的 SKOV3 细胞镜下图片，从图片上我们可以见到，与对照相比，使用顺铂 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 分别处理细胞后，细胞形态开始发生变化收缩变成圆形，存活细胞数目明显减少，逐渐开始有凋亡的细胞悬浮，然后用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DDP 加上 80 $\mu\text{g/mL}$ 的人参皂苷 Rg3，结果发现和单一使用 DDP 相比，加药后细胞变圆，凋亡细胞增多，本实验通过细胞形态学角度出发阐述了人参皂苷 Rg3 可以增加该细胞对于 DDP 的敏感性的效果。见图 4。

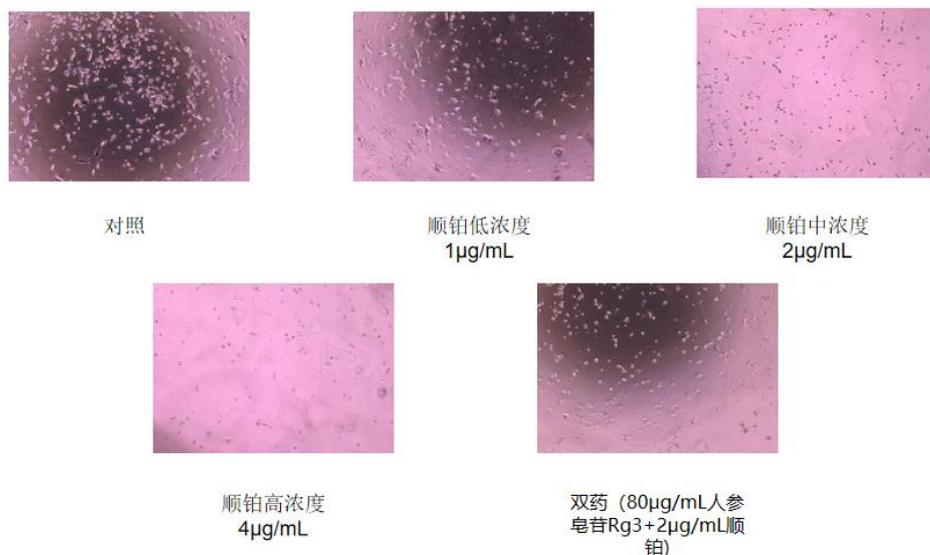


图 4 倒置显微镜观察细胞状态

2.3 人参皂苷 Rg3 对顺铂作用下卵巢癌细胞迁移的影响

从上述 CCK-8 的研究分析结果来看, 本实验研究使用 $1, 2 \mu\text{g/mL}$ 的 DDP 及联合人参皂苷 Rg3 处理卵巢癌细胞 48 小时后, 分析划痕变化结果, 探究两种药物在卵巢癌细胞迁移中的作用表现。研究所得结果显示, 和没有干扰的的对照组比较, 添加 $1, 2 \mu\text{g/mL}$ 的 DDP 的实验组愈合率是越来越小, 在 $2 \mu\text{g/mL}$ 的基础上添加人参皂苷 Rg3 后愈合率和未添加时比较愈合率变小, 由实验结果可以显示, DDP 可以通过药物剂量来影响卵巢癌细胞的划痕实验结果, 也就是该细胞的迁移效果, 人参皂苷 Rg3 能够进一步抑制 DDP 作用下的卵巢癌细胞的迁移效果。

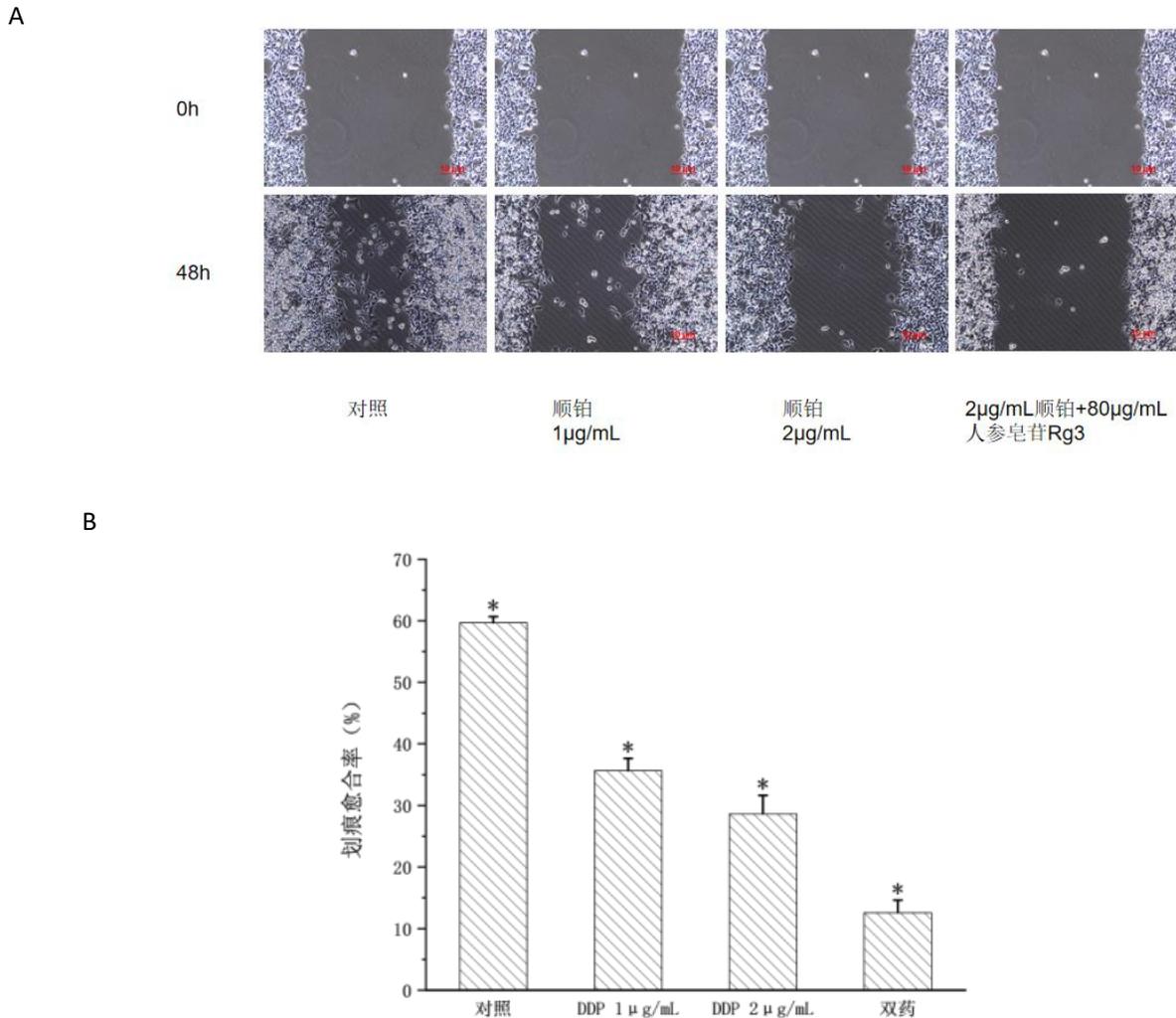


图5 人参皂苷 Rg3 对顺铂作用下卵巢癌细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4 人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞克隆形成能力的影响

为研究人参皂苷 Rg3 对顺铂作用下卵巢癌细胞的增殖的阻碍效果。本课题选用顺铂浓度 $1, 2, 4 \mu\text{g/mL}$ 以及与 $80 \mu\text{g/mL}$ 的人参皂苷 Rg3 联用的实验组来作用于卵巢癌细胞, 进行克隆形成实验。克隆形成结果显示, DDP 的浓度升高, SKOV3 细胞的克隆形成面积显著消减, 证明其能明显抑制实验细胞的复制, 在添加人参皂苷 Rg3 后效果更加明显 ($P < 0.05$)。结果表明, DDP 能抑制 SKOV3 的克隆生成抑制其增殖能力和人参皂苷 Rg3 合用能增加 DDP 的增殖抑制能力。见图 6。

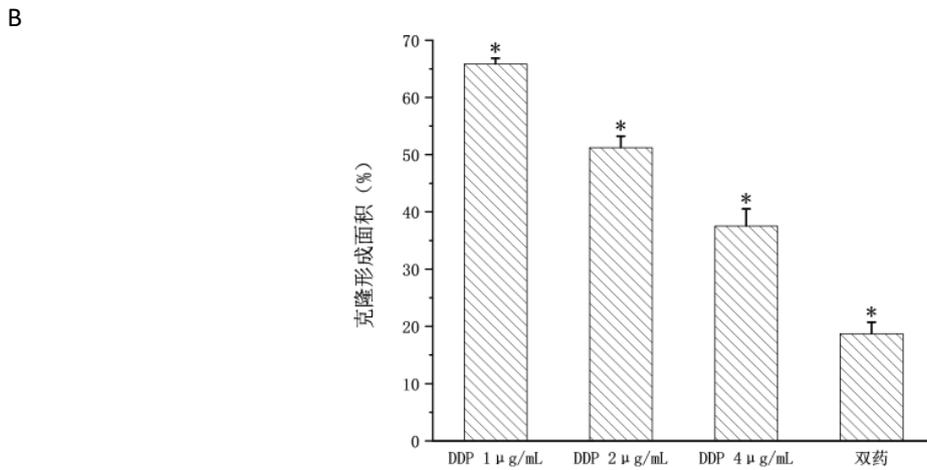
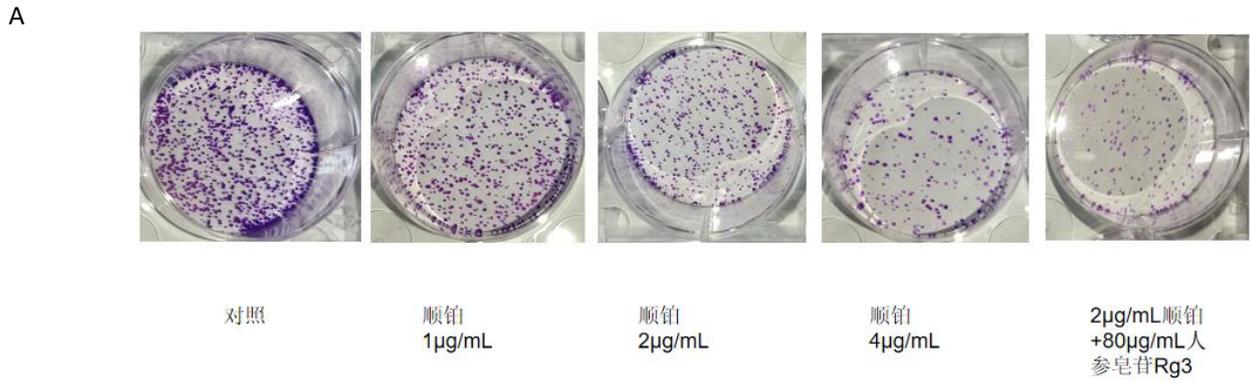


图 6 人参皂苷 Rg3 对顺铂作用下 SKOV3 细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

为研究人参皂苷 Rg3 抑制 SKOV3 以及其增敏的作用机制, 研究 SKOV3 细胞中的 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响。图片表明, PI3K、Akt、mTOR 蛋白随着人参皂苷 Rg3 的浓度增加, 其表达量降低。得出结论人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞的抑制作用可能与该通路有关。

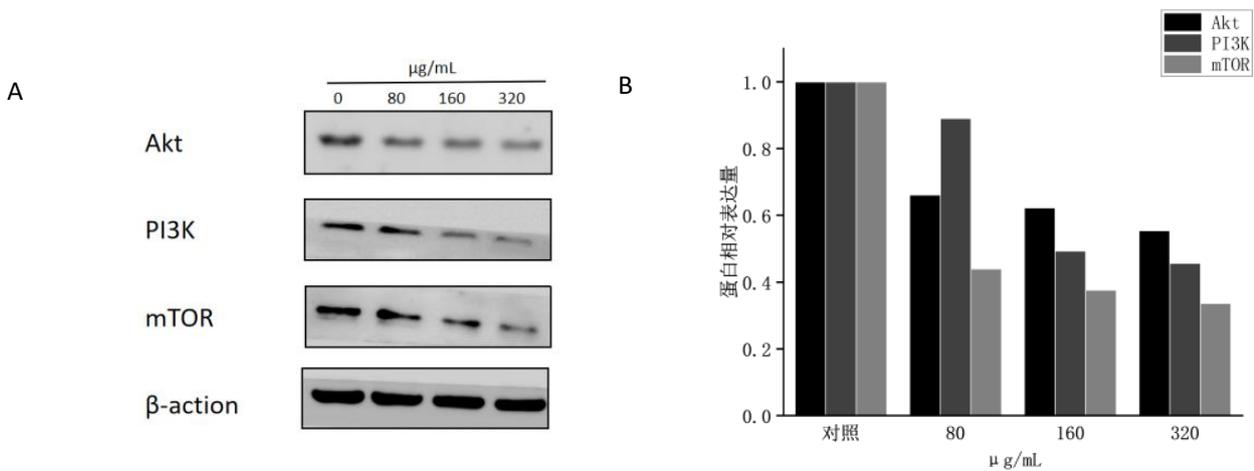


图 7 人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

3 讨论

在妇科肿瘤中，卵巢癌的致死率一直位居高位^[9]。化疗首选药物就是顺铂，它可以抑制包括卵巢癌在内的多种肿瘤的进展，但是其作为使用多年的老药，许多肿瘤细胞都对其产生了耐药性^[10]，所以寻找增加顺铂对肿瘤的化疗敏感性相关药物是目前肿瘤研究的方向。目前许多相关研究显示^[11]，人参皂苷 Rg3 有着非常广泛的抗肿瘤作用，在许多肿瘤细胞的研究当中，都可以抑制增殖促进凋亡并遏制肿瘤细胞，但具体机制尚不明朗。

在本文的研究考察了卵巢癌细胞在 DDP 和人参皂苷 Rg3 增殖克隆以及迁移的作用及其机制。第一组实验使用了上皮性卵巢癌细胞用于实验，用上述两种药物分开和联合作用于该细胞，调查它们对该细胞增殖的效果。实验当中采用 CCK-8 法研究人参皂苷 Rg3 对细胞存活率的作用，实验结果表明，药物浓度抬升，实验对象的存活率削减，作用时间的增长使得药物的半数抑制浓度减小，说明人参皂苷 Rg3 可以呈浓度以及时间依赖性的抑制 SKOV3 细胞。又用顺铂来直接作用于细胞，数据表明顺铂浓度增加，细胞存活率降低，加入 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人参皂苷 Rg3 后，24h, 48h, 72h 的半数抑制浓度为 7.16 和 2.11 和 1.57，均小于未加之前，可见人参皂苷 Rg3 可增加 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性。接下来镜下验证药物使用成果，由拍摄照片可以看到，与对照相比，使用顺铂 1, 2, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别处理细胞后，细胞形状开始有变化，缩小变圆形，存活细胞数目明显减少，逐渐开始有死亡的细胞悬浮，然后用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DDP 加上 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人参皂苷 Rg3，结果发现和单一使用 DDP 相比，加药后细胞变圆，凋亡细胞增多，本实验通过细胞形态学角度出发阐述了人参皂苷 Rg3 可以增加该细胞对于 DDP 的敏感性的效果。然后进行了细胞迁移的影响，发现 DDP 可以通过药物剂量来影响卵巢癌细胞的迁移效果，人参皂苷 Rg3 能够进一步抑制 DDP 作用下的卵巢癌细胞的迁移效果。本项研究同时也进行了细胞克隆形成实验，发现 DDP 的浓度抬升，SKOV3 的克隆形成显著削减，其中间浓度添加人参皂苷 Rg3 克隆形成结果相较未添加时克隆效果降低，表明其有良好的抗肿瘤效应。

为研究人参皂苷 Rg3 抑制 SKOV3 以及其增敏的作用机制，研究 SKOV3 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白的表达。该信号通路在各个肿瘤细胞的生物学行为中有着不可忽视的作用，它的作用如果不能发挥，通路上的相关蛋白活性降低，会使癌细胞对药物敏感性增加，同时存活率也会受影响。所以实验中也可以通过测定该通路上的蛋白表现来探究药物对细胞的影响作用方式。图片表明，PI3K/Akt/mTOR 信号通路上的蛋白随着人参皂苷 Rg3 的浓度增加，其表达量降低。得出结论人参皂苷 Rg3 对 SKOV3 细胞的抑制作用可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

4 结论

由于肿瘤的化疗治疗效果减弱甚至导致了治疗失败，因此提高肿瘤对药物的敏感性，对提高肿瘤患者生存率及生存质量具有重大临床意义。大量研究表明了中药化学成分有对肿瘤的抑制作用，显示了其在化疗药物增敏方面的前景。因此，重视中药活性物质肿瘤增敏的研究，对研制出新的毒性小且既有抗肿瘤又有增敏作用的抗肿瘤新药有正面的意义

综上所述，本课题结果发现，人参皂苷 Rg3 可以抑制 SKOV3 细胞的增殖和生长，顺铂增敏，对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路具有阻碍作用，并通过该方式来增敏。人参皂苷 Rg3 对该细胞的抑制作用值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 王根生,王悦.卵巢癌微环境与化疗耐药发生相关的研究进展[J].肿瘤,2020,40(01):68-75.
- [2] 王永,杨军文.卵巢癌对化疗药物耐药机制的研究进展[J].沈阳医学院学报,2021,23(03):300-303. DOI: 10.16753/j.cnki.1008-2344.2021.03.029.
- [3] 马玲.肿瘤标志物联合检测在卵巢疾病诊断中的临床价值探讨[J].人人健康,2020(05):152.

- [4] Xu JiaYue,Liu FangYuan,Liu ShaoXuan,*et al.* Plant-Derived Chinese Medicine Monomers on Ovarian Cancer via the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway: Review of Mechanisms and Prospects.[J]. Journal of oncology,2021,2021.
- [5] Pretorius R G,Hacker N F,Berek J S,*et al.* Pharmacokinetics of Ip cisplatin in refractory ovarian carcinoma.[J]. Cancer treatment reports,1983,67(12).
- [6] Coley Helen M,Hatzimichael Eleftheria,Blagden Sarah,*et al.* Polo Like Kinase 2 Tumour Suppressor and cancer biomarker: new perspectives on drug sensitivity/resistance in ovarian cancer.[J]. Oncotarget,2012,3(1).
- [7] Li Jialin,Yang Bo. Ginsenoside Rg3 enhances the radiosensitivity of lung cancer A549 and H1299 cells via the PI3K/AKT signaling pathway.[J]. In vitro cellular & developmental biology. Animal,2023,59 (1).
- [8] 唐立,徐惠亮,郝双影.人参皂苷 Rg3 调控 lncRNA-LINP1 抑制胃癌细胞生长的作用机制[J].医学研究生学报, 2020,33(11):1157-1160.DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2020.11.007.
- [9] 牛星燕,张冬萍,彭芸花.卵巢癌铂耐药机制及相关靶向治疗研究进展[J].中国妇产科临床杂志,2020,21(06):661-663.DOI:10.13390/j.issn.1672-1861.2020.06.038.
- [10] 申芳,徐佳越,刘芳媛,等.中药单体逆转卵巢癌顺铂耐药机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28 (03):226-233.DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20220324.
- [11] You Zhengchen,Yao Qi,Shen Jianhong,*et al.* Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg3 in mice via activation of the hippocampal BDNF signaling cascade.[J]. Journal of natural medicines,2017,71(2).