

·药效与毒理学研究·

人参总皂苷增强小鼠黑色素瘤 B16 细胞缝隙连接功能的实验研究

王苏萍¹, 张广献¹, 谭宇蕙¹, 肖建勇¹, 吴映雅¹, 杜标炎¹, 丘鹏翔², 刘娟¹(1. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 探讨人参总皂苷(total ginsenosides, TGs)对小鼠黑色素瘤 B16 细胞缝隙连接(Gap junction, GJ)功能的影响及其作用机制。方法 MTT 法测 TGs 对 B16 细胞生长的影响, 荧光显微镜结合荧光示踪法分析 GJ 功能变化, 以各试验组受体细胞均数与对照组的比值作为评价 GJ 功能的指标, 流式细胞仪检测对照组和实验组的绿色荧光供体细胞(G4)与双阴性受体细胞(G3)比值(G4/G3)变化分析 GJ 功能改变, Western blot 分析连接蛋白(Connexin, Cx)表达。结果 1~8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs 处理 B16 细胞 48 h 对其生长状态无明显影响; 用 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs 处理细胞 48 h 后, 荧光显微镜下观察, TGs 能明显提高 B16 细胞荧光染料 Calcein 传递, 对照组和实验组 G4/G3 比值分别是 0.06 ± 0.01 , 0.09 ± 0.02 , 0.10 ± 0.01 , 0.12 ± 0.03 和 0.13 ± 0.02 , 各实验组 G4/G3 值明显高于对照组($P < 0.01$); Western blot 分析结果显示, 用 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs 处理 B16 细胞 48 h 对其连接蛋白 Cx32 表达有明显的增强作用, 但对 Cx43 和 Cx26 表达无影响。结论 体外较低浓度 TGs 能够有效促进 B16 细胞 GJ 功能, 并具有一定的剂量-效应关系。1~8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs 虽能显著促进 B16 细胞 Cx32 蛋白的表达, 但在本试验浓度范围内并无明显的量效关系, 且对 Cx43 和 Cx26 表达无明显影响。

关键词: 人参总皂苷; 荧光示踪; B16 细胞; 缝隙连接; 连接蛋白; 流式细胞术

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)05-0437-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.05.001

Effects of Total Ginsenosides on Gap Junction Function in Melanoma B16 cells

WANG Suping¹, ZHANG Guangxian¹, TAN Yuhui¹, XIAO Jianyong¹, WU Yingya¹, DU Biaoyan¹, QIU Pengxiang², LIU Juan¹ (1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of total ginsenosides (TGs) on the gap junction(GJ) function in melanoma B16 cells, and to explore the possible mechanism. **Methods** Effects of TGs on the proliferation of B16 cells were determined by MTT. The gap junction function was analyzed by fluorescent tracer method under fluorescent microscope. The ratio of average count of the receptor cells in each test group to that in the control group was used as an evaluation index of GJ function, and flow cytometry was used to detect the ratio of G4 to G3 in Calcein labeled cells (G4) group and double negative cells(G3) group for the analysis of the changes of the gap junction function. The expression of connexins(Cx) was detected by Western blotting method. **Results** TGs at 1~8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ had no effect on the growth of B16 cells after co-culture for 48 h. After co-culture with 0, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of TGs for 48 h, the transfer of the Calcein in B16 cells was obviously enhanced under fluorescence microscope, and the G4/G3 ratio was 0.06 ± 0.01 in the control group, and was 0.09 ± 0.02 , 0.10 ± 0.01 , 0.12 ± 0.03 and 0.13 ± 0.02 in 1, 2, 4 and

收稿日期: 2013-03-22

作者简介: 王苏萍, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治肿瘤研究。Email: wangsuping317@163.com。通讯作者: 杜标炎, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肿瘤防治与肿瘤药理学。Email: dubiaoyan@gzhtcm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072906)。

8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs experimental groups, respectively, the G4/G3 ratio in the experimental groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The results of Western blotting showed that the expression of Cx32 in B16 cells was obviously increased after co-culture within 0, 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of TGs for 48 h, but TGs at the above concentrations had no effect on the expression of Cx43 and Cx26. **Conclusion** Low concentrations of TGs can effectively promote the gap junction function of B16 cells in a dose-dependent way in vitro. TGs at 1–8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ can significantly improve Cx32 protein expression in B16 cells, but show no obvious concentration-response relationship, and has no obvious influence on the expression of Cx43 and Cx26.

Keywords: Total ginsenosides; Fluorescent tracer; B16 cells; Gap junction; connexin; Flow cytometry

缝隙连接(Gap junction, GJ)是细胞间直接相互作用的主要方式,它是一种独特的细胞间通道,连接了两个相邻细胞的胞质,使两个细胞成为代谢共同体。其生理功能是协调细胞间活动的一致性,参与信息的传递和神经冲动的传导以及细胞的分化、生长与发育。GJ由六个多边形亚单位-连接蛋白(Cx)组成,邻细胞膜对应面上的一对Cx接合体构成缝隙连接通道,通过其开闭调节细胞内活性分子的分布,从而维持机体的动态平衡^[1-2]。但是,肿瘤细胞普遍存在GJ功能低下^[3],影响自杀基因治疗的旁杀伤效应,因此,提高和改善细胞GJ功能对肿瘤的自杀基因治疗非常重要。

人参总皂苷(total ginsenosides, TGs)是人参的主要活性成分,富含几十种人参单体皂苷,药理作用甚广,不仅能提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,还能提高机体抗肿瘤的免疫力^[4-7]。研究发现自杀基因联合TGs可抑制小鼠黑色素瘤的生长^[8],为进一步研究这种效应的作用机制,本文探讨TGs对B16细胞缝隙连接功能的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及培养方法 小鼠黑色素瘤B16细胞,购自中山大学细胞库,培养于含体积分数为10%胎牛血清的RPMI1640培养液中,置于37℃,体积分数为5%CO₂培养箱中培养至对数生长期,用胰酶消化传代培养。

1.2 药品和试剂 TGs,南京泽郎医药公司,批号:ZL20100716,纯度为80%,溶于无水乙醇中配成40 mmol·L⁻¹母液,分装,冻存备用;RPMI1640、胰酶, Gibco公司;胎牛血清, PAA公司;二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT), Sigma公司;荧光染料Calcein-AM(C3099)和DiI(V22885), Invitrogen公司;兔抗人 β -actin、Cx26、Cx32和Cx43单抗, Bio

Vision公司。

1.3 仪器 细胞培养箱(BNA-321D, Espec);倒置显微镜(XDS-1B型,重庆COIC公司);超净工作台(JH型,苏州净化设备厂);电动离心机(XYJ-801型,江苏省金坛市医疗仪器厂);酶标仪(680型, Bio Rad);流式细胞仪(EPICS XL, Beckman Coulter);荧光显微镜(IX71, Olympus);PowerPac300电泳仪及免疫印迹相关设备(Bio Rad);影像工作站4000R (Carestream Molecular Imaging, New Haven, USA)。

1.4 MTT法测定TGs对B16细胞生长的影响^[9] 用MTT法测定不同浓度TGs对B16细胞增殖的影响,以确定用于研究细胞间缝隙连接(Gap junctional intercellular communication, GJIC)功能的TGs浓度。

1.5 荧光示踪法测定GJ功能^[9] 采取荧光示踪法测定GJ通讯功能。用0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TGs处理细胞48 h后,供体细胞用DiI和Calcein-AM在培养箱共孵育30 min。将供体细胞按1:50比例接种到TGs处理的各组受体细胞上,在培养箱继续培养8 h,用荧光显微镜观察记录。每次试验,以各试验组受体细胞均数与对照组的比值作为评价GJ功能的指标。

1.6 流式细胞仪分析GJ功能^[9] TGs处理B16细胞48 h后,将供体细胞按1:50比例接种到TGs处理的各组受体细胞上,继续培养8 h,用流式细胞仪分析GJ功能。以绿色荧光供体细胞(G4)与双阴性受体细胞(G3)的比值作为评价GJ功能的指标,比值越大,表示细胞间的GJ通讯功能越强。每组实验重复3次。

1.7 Western blot检测Cx表达 TGs处理B16细胞48 h后,加细胞裂解液,裂解后提取蛋白,经SDS-PAGE电泳分离后转印。转印好的PVDF膜封闭后依次加入相应一抗和二抗,膜放入发光液中孵育后用X光片曝光显影,用影像工作站4000R对图像

进行扫描和分析,以条带灰度值与 β -action 的相对比值表示蛋白的表达水平^[10]。

1.8 统计学处理方法 所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。多组间比较采用方差分析,两组间比较采用两样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 TGs 对 B16 细胞生长的影响 1~8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TGs 处理 B16 细胞 48 h 对其生长无明显影响,即 TGs 在此浓度范围内对 B16 细胞既无细胞毒作用,也无促增殖作用,见表 1。但随 TGs 浓度的增加和作用时间的延长, TGs 对 B16 细胞抑制率增强,因此在 GJ 机制实验研究中,把 TGs 作用浓度控制在 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内,作用时间为 48 h。

2.2 荧光示踪法测定 GJ 功能 用 0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TGs 处理细胞 48 h 后,与对照组比较,各

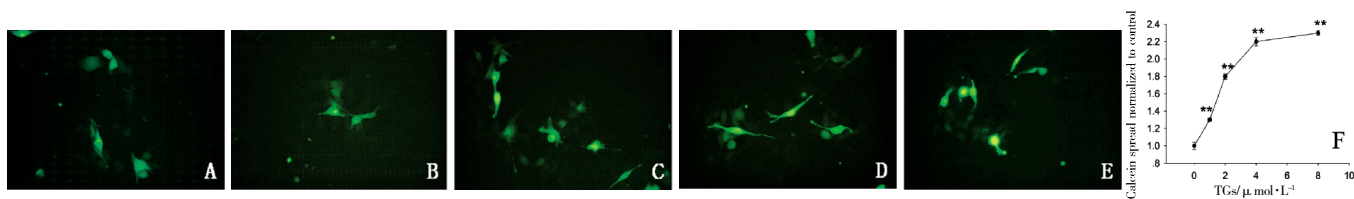
表 1 不同时间点和不同浓度 TGs 对 B16 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effects of different concentrations of TGs on cell growth of B16 cell in different time

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
0	1	1	1
1	1.04 $\pm$ 0.02**	0.99 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.00
2	1.06 $\pm$ 0.03**	0.98 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.04
4	1.03 $\pm$ 0.02*	0.98 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.04**
8	1.00 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.04**
16	0.99 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.02**	0.88 $\pm$ 0.03**
32	0.02 $\pm$ 0.00**	0.83 $\pm$ 0.02**	0.84 $\pm$ 0.02**
64	0.90 $\pm$ 0.03**	0.78 $\pm$ 0.01**	0.89 $\pm$ 0.01**

注:与对照组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

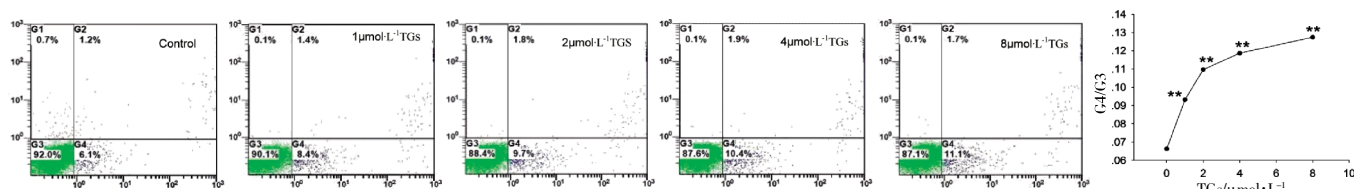
浓度 TGs 处理组均可明显促进 B16 细胞间荧光染料 Calcein 的传递($P < 0.01$),见图 1。



A. 对照组 B16 细胞 Calcein 传递(200 倍); B~E. TGs 处理组 B16 细胞 Calcein 传递(其浓度分别为 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TGs; 200 倍); F. TGs 促进 GJ 介导的 B16 细胞间 Calcein 传递,每个数据点代表各试验组受体细胞均数与对照组的比值($n=3$)。与对照组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 荧光显微镜观察 TGs 对 B16 细胞间 GJ 介导的荧光染料 Calcein 传递的影响

Figure 1 Effects of TGs on Calcein spread through GJ in B16 cells observed under a fluorescence microscope



G1: DiI 标记细胞; G2: DiI 和 Calcein 双标记细胞; G3: 双阴性细胞; G4: Calcein 标记细胞。与对照组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)比较, ** $P < 0.01$; $n=3$ 。

图 2 流式细胞仪分析 TGs 对 B16 细胞间缝隙连接通讯功能的影响

Figure 2 Effects of TGs on the GJIC function in B16 cells by flow cytometry

2.3 流式细胞仪测定 GJ 功能 用 0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TGs 处理细胞 48 h 后,对照组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和各实验组 G4/G3 比值分别是 0.06 ± 0.01 , 0.09 ± 0.02 , 0.10 ± 0.01 , 0.12 ± 0.03 , 0.13 ± 0.02 , 结果显示,各实验组 G4/G3 值均高于对照组 ($P < 0.01$);随着处理浓度增加,双阴性受体细胞通过 GJ 逐渐被 Calcein 标记为绿色荧光, G4 比例逐渐升高(图 2),相应双阴性细胞减少,说明体外 TGs 能促进 B16 细胞 GJ 功能,并与荧光显微镜观察结果基本一致。

2.4 TGs 对 Cx 表达影响 Western blot 检测结果显

示, TGs 处理前 Cx32 表达较低,处理后 Cx32 有较高表达,但表达水平与 TGs 浓度无明显依赖关系(图 3)。由于黑色素瘤 B16 细胞 Cx32 蛋白表达水平较低, TGs 可能通过上调 Cx32 蛋白表达促进其 GJ 功能。然而, TGs 对 B16 细胞 Cx43 和 Cx26 的表达未检测出。

3 讨论

GJ 为细胞间通讯连接的主要通道,只能允许 1000~1600 Da 以下的小分子通过。GJ 与自杀基因的

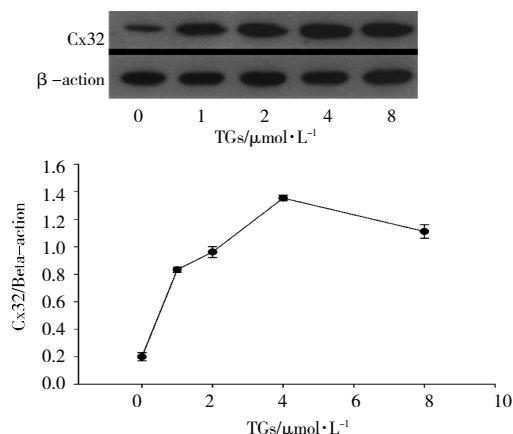


图3 Western blot分析TGs对B16细胞Cx32蛋白表达的影响
Figure 3 Effects of TGs on the expression of Cx32 in B16 cells by Western blot

旁杀伤效应密切相关。自杀基因是指在一定条件下可以引起细胞自动死亡的基因，自杀基因治疗的一个显著优势是存在旁杀伤效应。旁杀伤效应即为导入了自杀基因的细胞不仅自身被杀死，其邻近未导入自杀基因的细胞也被杀死的现象。其机制是转染自杀基因细胞转化产生的毒性代谢产物，通过GJ传输到未转染自杀基因的细胞，并导致其死亡。因此，我们可通过中药提高自杀基因的GJ功能来增强旁杀伤效应。

前期工作^[11]显示，TGs对接种转染tk的B16肿瘤细胞的C57小鼠肿瘤自杀基因治疗具有协同作用。为了解其协同作用的分子机制，本实验利用DiI荧光染料区分受体细胞和供体细胞，用Calcein荧光染料在B16细胞间传递，观察TGs对B16细胞GJ功能的提高作用，结果发现TGs能够有效地改善B16细胞GJ功能，从而提高自杀基因的旁杀伤效应。连接蛋白(Cx)是构成GJ的基本结构蛋白，是由多基因家族编码的一类结构相似而相对分子质量不同的蛋白质，也是一群具有相对特异性的肿瘤抑制因子^[12]。这种抑瘤效应依赖于细胞类型，即细胞在生理条件下有Cx的固有表达^[13]，Cx蛋白表达减少或定位异常可引起GJIC功能的下降，导致细胞异常生长或肿瘤的发生。益气补肾中药方能改善机体免疫微环境，通过神经递质、淋巴因子、激素等免疫活性物质介导GJ机制，增强肿瘤自杀基因系统的旁杀伤效应^[14-15]。因此，TGs能明显促进B16细胞Cx32基因的表达可能也是TGs改善GJ功能的分子基础。本试验浓度范围内各组均没有检测到B16细胞的Cx43和

Cx26的表达，可能是B16细胞Cx43和Cx26基因表达水平远低于Cx32所致。至于GJ功能与Cx32的表达并不完全匹配，这可能是TGs作用于Cx家族的其他蛋白所致。

参考文献:

- [1] Zhang A, Wang Q, Han Z, et al. Relationship between the expression of connexin 43 and bystander effect of suicide gene therapy in ovarian cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2004, 24(5): 476-479.
- [2] Niculescu Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy[J]. Mol Biotechnol, 2005, 30(1): 71-88.
- [3] Freidin M, Asche S, Bargiello TA, et al. Connexin 32 increases the proliferative response of Schwann cells to neuregulin-1 (Nrg1)[J]. PNAS, 2009, 106(9): 3567-3572.
- [4] 吕梦捷, 曾耀英, 宋兵. 人参皂苷Rb1对小鼠T淋巴细胞体外活化、增殖及凋亡的影响[J]. 中草药, 2011, 4(42): 743-748.
- [5] Son YM, Kwak CW, Lee YJ, et al. Ginsenoside Re enhances survival of human CD4⁺ T cells through regulation of autophagy[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(5): 626-631.
- [6] Yang Z, Chen A, Sun H, et al. Ginsenoside Rd elicits Th1 and Th2 immune responses to ovalbumin in mice[J]. Vaccine, 2007, 25(1): 161-169.
- [7] Lee JH, Han Y. Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4⁺ T cell[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(9): 1424-1430.
- [8] 杜标炎, 李药菊, 谭宇蕙, 等. 人参总皂苷对黑色素瘤自杀基因治疗的增效作用[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(4): 382-386.
- [9] 张广献, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 薯蓣皂苷对人肾癌786-0细胞缝隙连接功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 778-782.
- [10] 杜标炎, 张小贺, 谭宇蕙, 等. 六味地黄丸含药血清调控黑色素瘤B16细胞缝隙连接蛋白表达的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 152-156.
- [11] 李药菊, 杜标炎, 谭宇蕙, 等. 人参总皂苷对黑色素瘤自杀基因治疗的增效作用[J]. 广州中医药大学学报, 2011, 28(4): 382-386.
- [12] Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(6): 435-441.
- [13] 李立, 唐罗生. 细胞间隙连接蛋白与肿瘤[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(1): 175-178.
- [14] 宋淑霞, 吕占军. 扶正、补肾及益气补肾方药对肾虚老龄小鼠免疫功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(4): 387-392.
- [15] Alves LA, Nihei OK, Fonseca PC, et al. Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model[J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(4): 457-465.

(编辑: 梁进权)