doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.21.008

人参皂苷 Rb_1 对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞上皮－间质转化及 ROR1 表达的影响*

王 楠[1],廖 莎[1],陈 璐[1],黄 超[1],曹森林[1],范利锋[1△],王 莹[2]
(1. 湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院,湖北 十堰 442000; 2. 湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院生命科学研究所,湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨人参皂苷 Rb_1 通过干扰人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞上皮－间质转化(EMT)和Ⅰ型受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR1)的表达来影响乳腺癌的发生和发展的可行性。**方法** 细胞培养人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞生存率,并根据人参皂苷 Rb_1 的质量浓度分为空白对照组,高、中、低剂量组(240,120,60 μg/mL),阳性对照组(阿霉素,75 nmol/L)。采用细胞划痕法检测细胞的迁移能力,采用实时定量 PCR 检测细胞 ROR1 mRNA 的表达水平,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测细胞 ROR1 蛋白的表达水平。**结果** 与空白对照组比较,随着人参皂苷 Rb_1 质量浓度的增加,细胞的迁移能力显著降低,人参皂苷 Rb_1 各剂量组具有明显的量－效关系($P<0.05$),高剂量组与阳性对照组结果基本一致($P>0.05$);与空白对照组比较,随着人参皂苷质量浓度的增加,细胞生存率逐渐降低($P<0.05$),且高剂量组与阳性对照组结果一致($P>0.05$);与空白对照组比较,人参皂苷 Rb_1 各剂量组和阳性对照组 ROR1 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),随着质量浓度的增加,表达量逐渐降低,量－效关系明显($P<0.05$),人参皂苷 Rb_1 高剂量组与阳性对照组结果一致($P>0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rb_1 可能通过抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞上皮－间质转化和 ROR1 表达来减缓乳腺癌的发生、发展。

关键词:人参皂苷 Rb_1;人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞;上皮－间质转化;Ⅰ型受体酪氨酸激酶样孤儿受体
中图分类号:R932;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1006－4931(2020)21－0025－05

Effect of Ginsenoside Rb_1 on the Epithelial－Mesenchymal Transition and ROR1 Expression in Human Breast Cancer MDA－MB－231 Cells

WANG Nan[1], *LIAO Sha*[1], *CHEN Lu*[1], *HUANG Chao*[1], *CAO Senlin*[1], *FAN Lifeng*[1], *WANG Ying*[2]
(*1. Taihe Hospital · Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei, China 442000; 2. Institute of Life Sciences, Taihe Hospital · Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei, China 442000*)

Abstract:Objective To investigate the feasibility of ginsenoside Rb_1 affecting the occurrence and development of breast cancer by interfering with the epithelial－mesenchymal transition(EMT) and receptor tyrosine kinase－like orphan receptor 1(ROR1) expression in human breast cancer MDA－MB－231 cells. **Methods** Human breast cancer MDA－MB－231 cells were cultured and the cell survival rate was detected by the MTT method. According to the concentration of ginsenoside Rb_1, the MDA－MB－231 cells were divided into blank control group, high－dose group(240 μg/mL), medium－dose group(120 μg/mL), low－dose group(60 μg/mL) and positive control group(doxorubicin, 75 nmol/L). The cell migration ability was detected by the cell scratching method, the expression of cell ROR1 mRNA was detected by the real－time quantitative PCR, and the expression of cell ROR1 protein was detected by the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the blank control group, the cell migration ability was significantly decreased with the increase of the concentration of ginsenoside Rb_1, and the ginsenoside Rb_1 groups had a significant dose－effect relationship($P<0.05$), and the result of high－dose group was basically consistent with the positive control group($P>0.05$). Compared with the blank control group, the cell survival rate was gradually decreased with the increase of the concentration of ginsenoside Rb_1($P<0.05$), and the result of high－dose group was basically consistent with the positive control group($P>0.05$). Compared with the blank control group, the expression levels of ROR1 mRNA and protein in the ginsenoside Rb_1 groups and the positive control group were significantly decreased($P<0.05$). The expression level of ROR1 was gradually decreased with the increase of the dose, which had a significant dose－effect relationship($P<0.05$), and the result of high－dose group was basically consistent with the positive control group($P>0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb_1 may slow down the occurrence and development of breast cancer by inhibiting EMT and ROR1 expression in human breast cancer MDA－MB－231 cells.

Key words: ginsenoside Rb_1; human breast cancer MDA－MB－231 cells; epithelial－mesenchymal transition; receptor tyrosine kinase－like orphan receptor 1

*基金项目:湖北省自然科学基金[2019CFB105]。
第一作者:王楠,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为中西医结合治疗肿瘤及术后放化疗后康复治疗,(电子信箱)736085056@qq.com。
△通信作者:范利锋,男,硕士研究生,副主任医师,研究方向为中医肿瘤及肿瘤康复,(电子信箱)1057442902@qq.com。

乳腺癌是女性肿瘤中最常见的、死亡率最高的恶性肿瘤[1]，临床主要通过外科手术、放射治疗和化学治疗（简称化疗）相结合的综合治疗方式来提高患者的生存率[2]，尤其是转移性肿瘤患者的最佳选择[3]，但化疗存在恶心呕吐、食欲缺乏、毛发脱落等副作用，导致后期生存质量严重下降[4]。体外研究表明，上皮－间质转化（EMT）在乳腺癌转移到其他器官的过程中起到重要作用，其作用机制为上皮细胞获得间质细胞的生物特性[5]。化疗也可能导致肿瘤细胞的转移，促进其发生、发展[6]，故需找到一种温和的治疗方法来提高乳腺癌患者的生存率。人参为五加科植物，具有补气养血、增强免疫力、维持细胞内外环境稳定等作用[7]，人参有30多种人参皂苷单体，其中人参皂苷 Rg_1，Re，Rb_1 为主要效应成分[8]。人参皂苷对多种肿瘤都有很好的治疗作用，其中人参皂苷 Rb_1 对白血病、胃癌和卵巢癌都有一定的治疗效果[9]。Ⅰ型受体酪氨酸激酶样孤儿受体（ROR1）是一种Ⅰ型跨膜蛋白，在胚胎发育和肿瘤发生过程中表达[10]。ROR1在正常组织（甲状旁腺、胰岛、食道、胃和十二指肠[11]）等有表达，但在白血病中为过表达，在乳腺癌、黑素瘤、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、肾细胞癌[12]等实体肿瘤中尤为突出，且具有促进乳腺癌细胞增殖，抗凋亡和EMT[13]的作用，增强了癌细胞的转移。本研究中探讨了人参皂苷 Rb_1 能否通过影响人乳腺癌MDA－MB－231细胞EMT及ROR1的表达来减缓乳腺癌的发生、发展。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、试药与仪器

细胞：人乳腺癌MDA－MB－231细胞（武汉普诺赛生命科技有限公司）。

试药：人参皂苷 Rb_1（批号为100712－201223，中国食品药品检定研究院）；RPMI1640培养基（批号为502315），胎牛血清（批号为403652），胰蛋白酶（批号为202314），均购自美国Gibco公司；四甲基偶氮唑盐（MTT，批号为601452，美国Sun－Shine公司）。

仪器：Class Ⅱ型生物安全柜（瑞士Liestal公司）；600型 CO_2 细胞培养箱（美国Labconco公司）；SE115B型电泳仪（美国Thermo公司）；5320R 4 ℃离心机，TA500型倒置显微镜，均购自德国徕卡公司；LDZX－50K型高压蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）。

1.2 方法

细胞培养：细胞复苏后，将人乳腺癌MDA－MB－231细胞株置含有10%胎牛血清、青霉素（每1 mL 100 U）和链霉素（100 μg/mL）的RPMI1640培养基中，在5% CO_2、37 ℃培养箱中静置培养，每24 h更换1次培养基，在细胞覆盖率达70%时使用胰蛋白酶消化、传代。

MTT法检测细胞存活率：取对数生长期的人乳腺癌MDA－MB－231细胞，胰蛋白酶消化2 min，轻微吹打，制作细胞悬液，2 000 r/min离心10 min，弃上清液，加入含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中，轻微吹打，使细胞悬浮，接种至96孔板，每孔100 μL，放入培养箱培养24 h，去除培养基，加入培养基稀释的人参皂苷 Rb_1 溶液，使溶液质量浓度分别为500，250，125，62，31，15，7.5，3.75 μg/mL，设置为人参皂苷 Rb_1 1～8组，另设空白对照组和阳性对照组（顺铂，10 μg/mL），各组6个复孔，培养24 h，去除培养基，加入100 μL 10% MTT的空白培养基（5 mg/mL MTT）中，培养4 h后，弃去孔内培养基，加入二甲基亚砜100 μL，振荡混匀10 min，采用酶标仪分别于470 nm和590 nm波长处检测吸光度值（A），重复3次，按公式计算细胞生长抑制率［IC_{50} 为15.42 μg/mL］。

细胞抑制率（%）＝给药组吸光度/对照组吸光度×100%

细胞划痕法检测人乳腺癌MDA－MB－231细胞迁移能力：指定时间内，用不同质量浓度的人参皂苷 Rb_1（3.75～500 μg/mL）处理细胞，并确定后续试验的最佳质量浓度。将细胞以高密度接种于培养板，粘附，过夜。分别加入质量浓度为60，120，240 μg/mL的人参皂苷 Rb_1、阳性对照药物阿霉素75 nmol/L和空白对照，24 h后观察细胞迁移。在划痕（0 h）和24 h后使用TA500型倒置显微镜获得刮擦的图像。检查划痕间隙，并将间隙差异标准化为划痕的0 h间隙距离。

人参皂苷 Rb_1 干预后人乳腺癌MDA－MB－231细胞ROR1 mRNA表达水平检测：提取各组人乳腺癌MDA－MB－231细胞总RNA，进行反转录反应，反应体系为总RNA 1 μL，10mM dNTP混合物1 μL，Oligo（dT）20（50 μmol/L）1 μL，DEPC水9 μL，混匀后65 ℃加热5 min，迅速置冰上冷却，瞬时离心后加入，第一链合成缓冲液4 μL，0.1 mmol/L DDT 2 μL，核酸酶抑制剂1 μL，充分混匀，37 ℃孵育2 min，加入1 μL（200 U）M－MLV逆转录酶，混匀，37 ℃孵育50 min后再70 ℃加热15 min，终止反应。实时定量PCR试剂盒测定相关mRNA表达水平，PCR引物序列，ROR1正向引物5′－ATAGGCTCTATATATGCGAGTACG－3′，反向引物5′－TACCATCAGCAGAAGCATATTCAC－3′。实时定量反应体系为SYBR Green qPCR SuperMix 16.00 μL，上游引物（5 μmol/L）3.50 μL，下游引物（5 μmol/L）3.50 μL，模板DNA 3.00 μL，DEPC水6.5 μL，总共32.5 μL。反应条件：95 ℃，10 min；95 ℃，15 s；60 ℃，20 s；72 ℃，10 s；共40个循环。每个样品做3个复孔，通过相对基因定量方法（$2^{-\Delta\Delta CT}$ 法）计算、分析mRNA表达水平。

人参皂苷 Rb_1 干预后人乳腺癌MDA－MB－231细胞ROR1蛋白表达水平检测：在无菌操作台上去除细胞

培养皿，弃去培养基，加入 1 mL PBS 溶液和 100 μL 蛋白酶 K 溶液，刮培养皿底部 10 min，使细胞悬浮于溶液中，将液体转移至 1.5 mL EP 管中，用超声细胞破碎仪（3 000 r/min，2 min）使细胞破碎，4 ℃离心 20 min，取上清液，置 1 支新的 1.5 mL EP 管中。采用酶联免疫吸附（ELISA）法检测细胞中的 ROR1 蛋白水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\overline{X} \pm s$ 表示，通过单因素方差分析并采用 LSD－t 法进行多重比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对细胞存活率的影响

随着人参皂苷 Rb_1 质量浓度的增加，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞存活率逐渐降低。与空白对照组比较，阳性对照组和人参皂苷 Rb_1 组（1～8 组）人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞存活率显著降低（$P<0.05$），人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞存活率与人参皂苷 Rb_1 的质量浓度呈负相关，人参皂苷 Rb_1 1 组（500.00 μg/mL）与阳性对照组比较，对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞存活率的影响无明显差异（$P>0.05$）。结果见表 1。

表 1 不同质量浓度人参皂苷 Rb_1 对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞生长的影响（$n=3$）

组别		质量浓度（μg/mL）	细胞存活率（$\overline{X} \pm s$，%）
空白对照组		0	100.00±0.00
人参皂苷 Rb_1	1 组	500.00	17.25±2.11[a]
	2 组	250.00	20.56±2.53[a]
	3 组	125.00	32.21±2.78[a]
	4 组	62.00	47.74±3.51[a]
	5 组	31.00	63.59±5.12[a]
	6 组	15.00	91.24±9.15[a]
	7 组	7.50	95.21±10.21
	8 组	3.75	97.12±11.23
阳性对照组		10.00	16.31±2.05[a]

注：与空白对照组比较，[a] $P<0.05$。

2.2 对细胞迁移能力的影响

与空白对照组比较，给予人参皂苷 Rb_1 和阿霉素处理后，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的迁移能力降低，随着人参皂苷 Rb_1 质量浓度的增加，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的迁移能力逐渐降低（$P<0.05$），且呈明显的量－效关系。人参皂苷 Rb_1 高剂量组和阳性对照组对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞迁移能力的影响效果无显著差异（$P>0.05$）。详见表 2 和图 1。

表 2 不同质量浓度人参皂苷 Rb_1 对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞迁移能力、ROR1 mRNA 表达和 ROR1 蛋白表达的影响（$n=3$）

组别		质量浓度/浓度	迁移能力（$\overline{X} \pm s$，μm）	ROR1 mRNA（$\overline{X} \pm s$）	ROR1 蛋白（$\overline{X} \pm s$）
空白对照组		0 μg/mL	43.56±4.37	3.05±0.31	152.75±12.31
人参皂苷 Rb_1	低剂量组	60.00 μg/mL	28.74±3.26[a]	2.34±0.21[a]	112.44±10.21[a]
	中剂量组	120.00 μg/mL	18.22±3.14[ab]	1.82±0.14[ab]	91.12±8.24[ab]
	高剂量组	240.00 μg/mL	10.21±1.07[abc]	1.11±0.12[abc]	61.11±6.12[abc]
阳性对照组		75.00 nmol/L	9.82±1.01[abc]	0.82±0.07[abc]	52.82±6.07[abc]

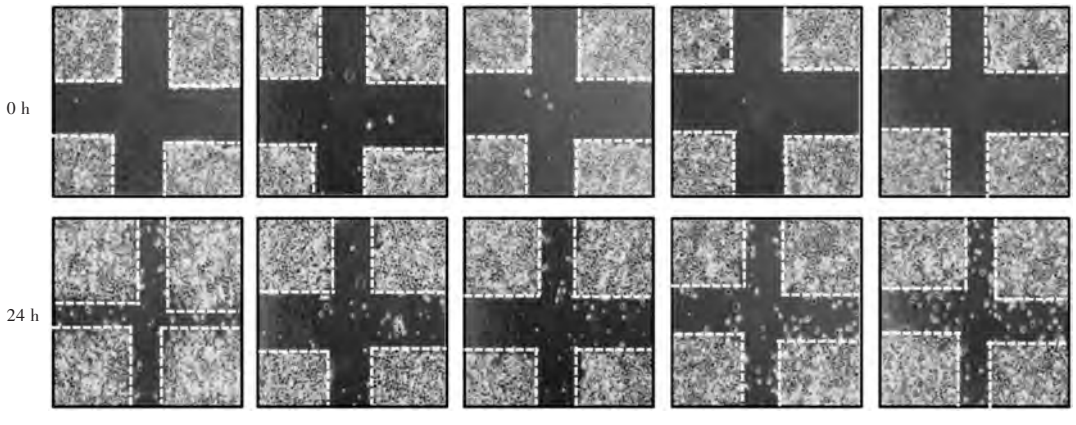
注：与空白对照组比较，[a] $P<0.05$；与人参皂苷 Rb_1 低剂量组比较，[b] $P<0.05$；与人参皂苷 Rb_1 中剂量组比较，[c] $P<0.05$。

2.3 干预后细胞 ROR1 mRNA 表达水平检测结果

与空白对照组比较，人参皂苷 Rb_1 各剂量组和阳性对照组，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 mRNA 表达水平降低，随着人参皂苷 Rb_1 质量浓度的增加，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 mRNA 表达水平逐渐降低（$P<0.05$），且呈明显的量－效关系。人参皂苷 Rb_1 高剂量组和阳性对照组对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 mRNA 表达水平的影响无显著差异。结果见表 2。

2.4 干预后细胞 ROR1 蛋白表达水平检测结果

与空白对照组比较，人参皂苷 Rb_1 各剂量组和阳性



A. 空白对照组 B. 阳性对照组 C. 人参皂苷 Rb_1 高剂量组 D. 人参皂苷 Rb_1 中剂量组 E. 人参皂苷 Rb_1 低剂量组

图 1 人参皂苷 Rb_1 对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞迁移能力的影响

对照组，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 蛋白表达水平降低，随着人参皂苷 Rb_1 质量浓度的增加，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 蛋白表达水平逐渐降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），且呈明显的量－效关系。人参皂苷 Rb_1 高剂量组和阳性对照组对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 ROR1 蛋白表达水平的影响无显著差异。结果见表2。

3 讨论

乳腺癌的分子异质性导致亚命名，而这些亚命名对预后、治疗反应和/或疾病进程具有信息意义[14]。乳腺癌可通过多种转移侵入机制进入其他组织器官，加重病情，但多数研究结果表明，EMT 在乳腺癌的侵袭转移过程中起到了重要作用[15]。发生 EMT 时，肿瘤细胞形态发生改变，由上皮细胞形态转变为梭形间充质细胞形态，导致细胞间的黏附力和极性丧失，且伴有神经型钙黏蛋白和波形蛋白的表达水平增加，上皮型钙黏蛋白表达水平降低，导致细胞迁移能力和侵袭能力增加，促进原发肿瘤的传播[16]。

ROR1 在胚胎发育中表达，在许多上皮性肿瘤和某些 B 细胞恶性肿瘤中表现出高水平和均匀的细胞表面表达。许多肿瘤中 ROR1 的表达与预后不良密切相关[17]，其在肿瘤中的重要作用促使早期的治疗研究，包括抗 ROR1 抗体、抗体药物结合物（抗体与细菌毒素融合）的开发、嵌合抗原受体 T 细胞治疗及小分子抑制剂等[14]。给予 iRNA 干扰具有转移倾向的乳腺癌细胞系中 ROR1 mRNA 的表达，或干扰 ROR1 蛋白的合成后，能抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力，同时减少 EMT 相关基因的表达水平，表明 ROR1 可能是乳腺癌的治疗潜在靶点。

人参中的人参皂苷种类有 30 多种，其中人参皂苷 Rb_1 为其重要组成成分，可抑制体外细胞的迁移能力，降低 EMT 标志物的表达，防止乳腺癌细胞的转移。研究发现，人参皂苷 Rg_1 可激活雌激素反应细胞中相关通路蛋白的表达，降低乳腺癌细胞活性，促进其凋亡，同时可抑制乳腺癌患者体内相关促癌因子的表达，降低乳腺癌术后的复发率[18]。

本研究结果显示，人参皂苷 Rb_1 可抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的生长，在给予人参皂苷 Rb_1 干预后，人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的生长受到抑制，且随着人参皂苷 Rb_1 干预剂量的增加，对人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的抑制率逐渐升高。通过细胞迁移结果显示，随着人参皂苷 Rb_1 剂量的增加，细胞迁移距离逐渐降低，表明人参皂苷 Rb_1 可能通过抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 EMT 转化来抑制细胞的转移，达到防止乳腺癌细胞进一步扩散的目的。ROR1 可促进人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的繁殖及迁移能力，干预后，ROR1 mRNA 和蛋白表达均受到抑制，表明 ROR1 可能是人参皂苷 Rb_1 的一个作用靶点，通过作用 ROR1 基因的表达来抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞的繁殖，达到防止乳腺癌的发生、发展，为乳腺癌的治疗提供了新思路，与细胞迁移力和 MTT 实验的结果相一致。因此，人参皂苷 Rb_1 可能是通过抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞迁移和 ROR1 的表达来抑制乳腺癌的发生。

综上所述，人参皂苷 Rb_1 可能通过抑制人乳腺癌 MDA－MB－231 细胞 EMT 和 ROR1 表达来减缓乳腺癌的发生、发展，为乳腺癌的治疗提供了新的研究方向。

参考文献：

[1] POLESZCZUK J, LUDDY K, CHEN L, et al. Neoadjuvant radiotherapy of early－stage breast cancer and long－term disease－free survival[J]. Breast Cancer Res, 2017, 19(1): 75.

[2] MILLER KD, NOGUEIRA L, MARIOTTO AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363－385.

[3] ZHANG N, ZHANG H, YANG Q. Comparative prognostic analysis for triple－negative breast cancer with metaplastic and invasive ductal carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2019, 72(6): 418－424.

[4] 潘　丽，刘玉梅，张自强，等. 褪黑激素对神经元保护作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2018，34(4)：479－481.

[5] CHAMARAUX－TRANTN, MATHELIN C, APRAHAMIAN M, et al. Antitumor effects of lidocaine on human breast cancer cells: An *in vitro* and *in vivo* experimental trial[J]. Anticancer Res, 2018, 38(1): 95－105.

[6] 罗秋月，张　青，熊绍权，等. 化疗促肿瘤转移的机制研究[J]. 医学研究生学报，2019，32(3)：307－312.

[7] 胡　超，周　静，许琼明，等. 人参皂苷 Rb_1 对肾脏疾病影响研究进展[J]. 辽宁化工，2018，47(11)：1153－1155.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2015：156－163.

[9] 朱晓丽. 人参皂苷药理作用研究进展[J]. 中国药物经济学，2017，12(12)：152－154.

[10] GOHIL SH, PAREDESMOSCOSSO SR, HARRASSER M, et al. An ROR1 bi－specific T－cell engager provides effective targeting and cytotoxicity against a range of solid tumors[J]. Oncoimmunology, 2017, 6(7): e1326437.

[11] HOJJAT－FARSANGI M, DANESHMANESH AH, KHAN AS, et al. First－in－class oral small molecule inhibitor of the tyrosine kinase ROR1 (KAN0439834) induced significant apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. Leukemia, 2018, 32(10): 2291－2295.

[12] HENRY CE, EMMANUEL C, LAMBIE N, et al. Distinct Patterns of Stromal and Tumor Expression of ROR1 and ROR2 in Histological Subtypes of Epithelial Ovarian Cancer[J]. Transl Oncol, 2017, 10(3): 346－356.

[13] LI C, WANG S, XING Z, et al. A ROR1－HER3－lncRNA signalling axis modulates the Hippo－YAP pathway to regulate bone