

## · 药理实验与临床观察 ·

## 人参总皂苷诱导 K562 细胞凋亡的实验研究

陈婷梅<sup>1</sup>, 王亚平<sup>2</sup>, 陈地龙<sup>2</sup>, 李 静<sup>2\*</sup>

(1. 重庆医科大学 检验系临床免疫学教研室, 重庆 400016 2 重庆医科大学 组织胚胎学教研室, 重庆 400016)

**摘要:** 目的 研究人参总皂苷诱导白血病细胞凋亡及其机制, 为进一步开发人参总皂苷提供实验依据。方法 采用细胞体外培养、图象分析技术、流式细胞术、形态学观察与免疫细胞化学等方法, 研究人参总皂苷诱导 K562 细胞凋亡。结果 人参总皂苷对 K562 细胞有增殖抑制作用, 并可诱导 K562 细胞凋亡明显增加, 同时 K562 细胞癌基因产物 C-MYC, BCL-2 表达明显降低。结论 人参总皂苷能诱导 K562 细胞凋亡, 其机制可能与调控癌基因产物的表达有关。

关键词: 人参总皂苷; K562; 凋亡

中图分类号: R733.7; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0235-03

## Experimental study on effect of apoptosis of K562 cells treated with TSPG

CHEN Ting-mei<sup>1</sup>, WANG Ya-ping<sup>2</sup>, CHEN Di-long<sup>2</sup>, LI Jing<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Immunology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;

2. Department of Histology and Embryology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract Object** To clarify the mechanism for total saponins of *Panax ginseng* C. A. Mey. (TSPG) inducing K562 cells to apoptosis, and to provide the theoretical basis and the experimental evidence of TSPG's clinical application. **Methods** By using *in vitro* cell culture, morphometry, flow cytometry, morphological investigation and immunocytochemistry, the effects of TSPG on apoptosis in K562 cells were studied. **Results** The results indicated that TSPG could inhibit the proliferation of K562 cells significantly, and induce K562 cells to apoptosis. It was also showed in the experiments that after induced by TSPG, the ratio of positive K562 cells expressing C-MYC and BCL-2 is decreased. **Conclusion** The mechanism for TSPG to induce K562 cells to apoptosis may be related to the expression of oncogene in K562 cells.

**Key words** total saponins of *Panax ginseng* C. A. Mey (TSPG); K562 cells; apoptosis

人参是祖国传统医学的“补气”要药, 以其攻补兼施, 毒副作用小, 注重整体的优越性已得到广泛认可。人参皂苷是其中的主要药物成分。研究表明人参总皂苷 (total saponins of *Panax ginseng* C. A. Mey., TSPG) 对造血干、祖细胞的增殖分化有显著的促进作用<sup>[1]</sup>。此外, TSPG 还对 K562, HL-60 细胞具有增殖抑制和诱导分化作用<sup>[2]</sup>。本实验采用现代生物学技术探讨 TSPG 对白血病细胞诱导凋亡的影响及基因调控, 旨在寻找和开发能抑制白血病细胞增殖并诱导其分化和凋亡的毒副作用小或无的中药诱导剂

## 1 材料与方法

## 1.1 材料: 人参总皂苷: 重庆中药研究所刁长发教

授惠赠, 纯度 95% 以上, 用 RPMI-1640 液配成所需浓度。K562 细胞: 由本校临床生化教研室惠赠, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液常规传代培养。RPMI-1640 培养基: 美国 Gibco 公司产品; 小牛血清 (批号 990402) 购自杭州四季青公司。小鼠抗人 C-MYC, BCL-2 单克隆抗体、SP 染色组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。TUNEL 检测试剂盒: Roche 公司产品

## 1.2 实验方法

1.2.1 TSPG 对 K562 细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期的 K562 细胞, 使细胞终浓度为  $\times 10^5 / \text{mL}$ 。实验组: 培养体系中加入不同浓度的 TSPG (50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ); 对照组: 加等量的 RPMI-

\* 收稿日期: 2002-10-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39670880); 重庆市中医药科学基金项目

作者简介: 陈婷梅 (1969-), 女, 重庆市人, 1992 年获检验医学学士学位, 1995 年获临床检验诊断学硕士学位。现在重庆医科大学检验系临床免疫学教研室任讲师。主要研究方向: 造血调控及其机制的研究, 肿瘤细胞逆转、分化和凋亡及其机制的研究。

Tel (023) 68733240 (O), (023) 68733235 (H) E-mail: chentingmei@sohu.com

1640液 分别在培养的 2, 4, 6 d取样,进行台盼蓝染色,计数活细胞数

1.2.2 细胞周期测定:取对数生长期的 K562 细胞,使细胞终浓度为  $1 \times 10^5$  /mL 实验组:在培养体系中加入终浓度为 100, 200  $\mu$ g /mL TSPG;对照组加入等量的 RPMI-1640液,培养 3 d,经流式细胞仪检测,分析得出细胞周期各时相的比例

1.2.3 细胞光镜形态学观察:取各实验组 (100, 200  $\mu$ g /mL作用 6 d)和对照组的细胞离心甩片,瑞氏染色,光镜下观察细胞形态学改变 每例用图象分析仪随机测量 300个细胞,计算凋亡细胞的百分率

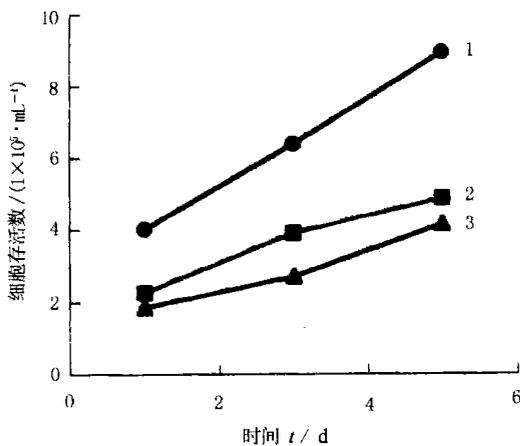
1.2.4 电镜超微结构观察:取实验组和对照组的细胞经 3% 戊二醛固定,经脱水、环氧树脂包埋超薄切片,染色后用 H-600透射电镜观察。

1.2.5 TUNEL检测试剂盒观察凋亡细胞:方法按试剂盒说明书进行。

1.2.6 TSPG对 K562 细胞表达的癌基因产物 C-MYC, BCL-2的影响:取对照组和实验组细胞, PBS洗涤后离心甩片,以小鼠抗人 C-MYC, BCL-2 单克隆抗体进行免疫细胞化学 SP法染色,同时设立不加一抗的阴性对照组,图象分析仪计数每例 300个细胞,计算表达阳性率。

## 2 结果

2.1 TSPG对 K562 细胞的增殖抑制作用:结果显示 TSPG对 K562 细胞的增殖抑制作用与药物的浓度和作用时间有关 (图 1)



1-对照 2-TSPG 100  $\mu$ g /mL 3-TSPG 200  $\mu$ g /mL

1-control 2-TSPG 100  $\mu$ g /mL 3-TSPG 200  $\mu$ g /mL

图 1 人参总皂苷对 K562 细胞增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibition of TSPG on proliferation of K562 cells

2.2 TSPG对 K562 细胞周期的影响:对照组细胞 S期占 58.02%, G2+ M 期细胞为 3.46%,而 G0/G1 细胞占 37.49%,说明 K562 细胞处于增殖旺盛

状态。K562 细胞经 TSPG 100  $\mu$ g /mL作用 3 d,细胞周期各时相比与对照组无显著性差异,处于 sub-G1 期的凋亡细胞百分比为 6.35%。而 K562 细胞经 TSPG 200  $\mu$ g /mL作用 3 d, S期占 43.44%, G2+ M 期细胞为 3.91%, G0/G1 细胞为 52.65%,与对照组细胞相比有显著性差异,处于 sub-G1 期的凋亡细胞百分比为 12.66%,表明 TSPG 200  $\mu$ g /mL作用 K562 细胞 3 d能阻止 K562 细胞从 G0/G1 期向 G2/M+ S 期移行,并能诱导部分 K562 细胞呈现 sub-G1 期的凋亡峰,从而发生凋亡 见表 1

表 1 TSPG 对 K562 细胞周期的影响

Table 1 Effect of TSPG on cell cycle of K562 cells

组别	剂量 ( $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$ )	细胞周期 %		
		G0/G1	S	G2+ M
对照	-	37.49 $\pm$ 4.63	58.02 $\pm$ 5.97	3.46 $\pm$ 2.25
TSPG	100	44.13 $\pm$ 2.45	51.92 $\pm$ 4.01	3.87 $\pm$ 2.26
	200	52.60 $\pm$ 6.15	43.44 $\pm$ 7.22	3.91 $\pm$ 1.69

与对照组比较: \*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.01$  vs control group

2.3 光镜形态学观察:经 100, 200  $\mu$ g /mL TSPG 作用的 K562 细胞,部分细胞呈现典型的凋亡细胞形态学改变,细胞体积缩小,胞浆凝缩,部分细胞核固缩呈均一致密物,部分细胞核核膜消失,细胞核断裂呈小块或碎片状,但细胞膜完整并可见凋亡小体。此外,还有部分细胞胞体减小,核浆比例减小,形态趋向成熟方向分化,见表 2

表 2 TSPG 对 K562 细胞凋亡的影响

Table 2 Effect of TSPG on apoptosis of K562 cells

组别	剂量 ( $\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1}$ )	凋亡细胞阳性率 %	
		形态学检测法	TUNEL 检测法
对照	-	2.0 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 1.2
TSPG	100	12.7 $\pm$ 2.8	39.4 $\pm$ 3.9
	200	36.7 $\pm$ 2.4	61.2 $\pm$ 3.4

与对照组比较: \*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.01$  vs control group

2.4 电镜超微结构观察:凋亡细胞胞浆浓缩,电子密度增加,部分细胞核染色质固缩凝集成块,部分细胞核裂解为碎块。

2.5 TUNEL 检测试剂盒观察凋亡细胞:经 100, 200  $\mu$ g /mL TSPG作用 1 d 的 K562 细胞, TUNEL 检测凋亡细胞阳性率与对照组相比有显著性差异,见表 2

2.6 TSPG 对 K562 细胞表达癌基因产物 C-MYC, BCL-2 的影响: 200  $\mu$ g /mL TSPG 作用 6 d, K562 细胞的 C-MYC, BCL-2 表达均降低,与对照组相比有统计学意义;而 100  $\mu$ g /mL TSPG 作用

后 K562 细胞的 BCL-2 表达降低, C-MYC 降低不明显, 见表 3

表 3 TSPG 对 K562 细胞 C-MYC, BCL-2 表达的影响

Table 3 Effect of TSPG on expression of C-MYC, BCL-2 in K562 cells

组别	剂 量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	阳性率 %	
		C-MYC	BCL-2
对照	-	89.93 $\pm$ 9.66	91.33 $\pm$ 8.27
TSPG	100	87.26 $\pm$ 3.22	85.36 $\pm$ 4.02
	200	76.80 $\pm$ 4.65	79.95 $\pm$ 4.36

与对照组比较: \*  $P < 0.05$

\*  $P < 0.05$  vs control group

### 3 讨论

细胞凋亡是受基因调控的主动的细胞死亡过程, 有其特征性的形态和生化特征。凋亡细胞的主要特征是细胞增殖抑制, 流式细胞仪检测出现凋亡细胞特征峰 (sub-G1 峰), 细胞胞浆浓缩致密, 核染色质凝集, 核裂解形成凋亡小体和核 DNA 断裂成 180~200 bp 的小片段。本实验从形态学、流式细胞仪和 TUNEL 检测来确认细胞凋亡的发生。从增殖抑制曲线来看, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 均能使 K562 细胞数量明显下降; 用流式细胞仪检测也表明: 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 均能使 K562 细胞发生凋亡, 凋亡细胞百分率分别为 6.35%, 12.66%, 而且 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 还能阻止 K562 细胞从 G0/G1 期向 G2/M+ S 期移行; 从光镜、电镜形态学上观察了 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡的情况, 均发现有典型的凋亡细胞, 并可见到凋亡小体。此外, 本实验采用检测细胞核 DNA 断裂的 TUNEL 法对单个细胞凋亡做原位检测, 结果表明: 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 均能使 K562 细胞凋亡阳性率增加, 且细胞核 DNA 断裂早于形态学改变, 也提示细胞凋亡是一有序、有调控的走向死亡过程。

从实验结果中还发现: 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 不仅能诱导 K562 细胞凋亡, 还可诱导 K562 细胞向红系、粒系较成熟细胞方向分化<sup>[2]</sup>, 提示 TSPG 对细胞增殖、分化和凋亡均有影响, 但其具体作用方式不清楚。文献报道白血病细胞凋亡与其所处分化状态有关, 处于分化状态的白血病细胞更易被诱导凋亡<sup>[3]</sup>, 如全反式维甲酸在诱导细胞分化的同时也

能诱导凋亡的发生<sup>[4]</sup>, 或诱导细胞凋亡和细胞分化分别发生<sup>[5]</sup>。本实验证实了前者, 即在诱导细胞分化的同时也能诱导细胞凋亡的发生, 此现象的产生提示 TSPG 诱导白血病细胞分化与凋亡的机制可能存在内在的联系, 其机制有待进一步研究和阐明。

原癌基因 bcl-2 有很强的抑制细胞凋亡的能力; BCL-2 蛋白广泛存在于细胞的线粒体膜、细胞膜内表面、内质网、核膜等处, BCL-2 蛋白的高表达能阻断多种细胞毒药物及 X 线诱发的白血病细胞凋亡<sup>[6]</sup>。在多种人类肿瘤细胞中都发现有 c-myc 基因的高表达, 它能促进细胞增殖, 抑制细胞分化, 人类 c-myc 基因编码 DNA 结合蛋白, C-MYC 蛋白作为重要的转录调节因子, 既可激活介导细胞增殖的基因, 也可激活介导细胞凋亡的基因。本实验利用免疫细胞化学技术检测了 TSPG 作用前后 K562 细胞 BCL-2, C-MYC 的表达情况, 结果表明 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 作用 K562 细胞 BCL-2 表达降低, 提示 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡的机制可能与对 BCL-2 的调控有关。此外, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 还能使 K562 细胞 C-MYC 降低, 而 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TSPG 作用后 K562 细胞 C-MYC 降低不明显, 这与细胞周期的检测结果相符, 这可能是 TSPG 抑制 K562 细胞增殖的机制之一。

### References

- [1] Wang Y, Wang S L, Wang Y P, et al. Effect of total saponins of *Panax ginseng* on the bioactivity and mRNA expression of hematopoietic growth factors [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1990, 30(4): 362-366.
- [2] Chen T M, Wang Y P. Experimental study on the effect of proliferation and differentiation of K562 cell treated with TSPG [J]. *Acta Univ Sci Med Chongqing* (重庆医科大学学报), 1999, 24(2): 115-119.
- [3] Martin S J, Bradley J G, Cotter T G. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis [J]. *Clin Exp Immunol*, 1990, 79: 448-453.
- [4] Anzai N, Kawabata H, Hirama T, et al. Marked apoptosis of human myelomonocytic leukemia cell line P39, significance of cellular differentiation [J]. *Leukemia* 1994, (8): 446-453.
- [5] Delia D, Aiello A, Lombardi L, et al. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid [J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 6036-6041.
- [6] Campos L, Keith F J, Gozyco W, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy [J]. *Blood*, 1993, 81: 3091-3096.

保 护 植 被 造 福 子 孙