

人参多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响

李建平¹, 何 轩¹, 姜 蓉¹, 李 静¹, 左国伟², 雷翠蓉¹, 王亚平¹, 王建伟¹, 陈地龙¹

1. 重庆医科大学 组织胚胎教研室 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆 400016

摘 要: **目的** 利用基因表达谱芯片研究人参多糖对体外培养的人红白血病 K562 细胞基因表达谱的影响。**方法** 人参多糖处理 K562 细胞 48 h 后, 分别提取给药组和对照组 K562 细胞总 RNA, 将两组 RNA 纯化 mRNA, 逆转录成 cDNA, 用 2 种不同的荧光染料 Cy3 和 Cy5 进行线性扩增标记, 与 Illumina 全基因组表达谱基因芯片杂交, 采用生物信息学方法分析人参多糖处理后 K562 细胞基因表达谱的改变。**结果** 共发现差异基因 306 个, 其中上调基因 220 个, 下调基因 86 个, 并对其生物学功能分类。**结论** 诱导肿瘤细胞分化是多基因作用的综合结果, 筛选的基因对研究肿瘤发生、发展与逆转分化, 以及寻找潜在的抗肿瘤药物作用靶点可能有意义。

关键词: 人参多糖; K562 细胞; 基因表达谱; 基因芯片; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0940-04

Effect of ginseng polysaccharide on gene expression profile of K562 cells

LI Jian-ping¹, HE Xuan¹, JIANG Rong¹, LI Jing¹, ZUO Guo-wei², LEI Cui-rong¹, WANG Ya-ping¹,
WANG Jian-wei¹, CHEN Di-long¹

1. Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Key Laboratories of Clinical Diagnostics, Province and Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ginseng polysaccharide on the gene expression profile of human erythroleukemia K562 cells cultured *in vitro*. **Methods** The total RNAs treated with ginseng polysaccharide for 48 h were extracted from both K562 cells and the control K562 cells. All the RNAs were purified into mRNA and then converted to double-stranded cDNAs by reverse transcription. The cDNAs were labeled with a fluorescence dye Cy3 or Cy5 and hybridized to a Illumina whole-genome oligonucleotide microarray. The change in the gene expression profile of K562 cells following treatment with ginseng polysaccharide was analyzed by using bioinformatics. **Results** A total of 306 differential genes were found. Of which 220 were up-regulated and 86 were down-regulated. Their biologic function was classified. **Conclusion** Tumor cell differentiation is multiple genes comprehensive results, the screening of the genes may be meaningful for understanding tumorigenesis, tumor development, reverse polarization, and finding potential drug targets.

Key words: ginseng polysaccharide; K562 cells; gene expression profile; gene chip; antitumor

人参是中医补气要药, 具有补气生血之功效, 人参多糖(ginseng polysaccharide)是其主要药用成分之一^[1]。研究表明, 人参多糖可抑制 K562 细胞的增殖, 诱导其成熟分化和凋亡^[2-3], 但其抗白血病作用的机制仍不清楚。本实验应用 Illumina 全基因组表达谱基因芯片, 从分子水平检测人参多糖作用前后 K562 细胞的基因表达差异, 以揭示人参多糖抗

白血病的作用机制。

1 材料

1.1 药品

人参多糖注射液(批号 20071201, 规格 3 mg/mL)为山西普德药业有限公司生产。以 RPMI 1640 培养液配制, 滤过除菌。

1.2 细胞

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873406)

作者简介: 李建平(1970—), 男, 重庆万州人, 硕士, 研究方向为造血调控机制。Tel: (023)68485787 E-mail: 85297426@qq.com

*通讯作者 陈地龙 Tel: (023)68485614

人红白血病 K562 细胞株, 本校检验系血液学实验室惠赠, 将其在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中常规培养, 每 2~3 天换液传代。

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基, 美国 Gibco 公司; 小牛血清, 杭州四季清公司; 6 孔培养板, 美国 Falcon 公司; dNTPs, Promega 公司; TRIzol 试剂, 美国 Invitrogen Life Technologies 公司; Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP, Amersham Pharmacia Biotech 公司; Illumina 芯片杂交试剂盒, Illumina 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

实验分为 2 组, 实验组 K562 细胞接种于含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 取对数生长期的细胞, 调整浓度为 $7 \times 10^8/L$, 加入人参多糖, 使其终质量浓度为 400 $\mu g/mL$, 在 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 、饱和湿度下常规培养 48 h。对照组除不加人参多糖外, 其余操作相同。每组各设 3 个复孔。

2.2 RNA 抽提及探针制备

每个样本各取细胞 1×10^7 个, 用 Unizol 法抽提细胞总 RNA, 电泳结果显示 18 S 和 28 S RNA 条带清晰; 逆转录合成和纯化 cDNA 探针, 用 Cy3-dCTP 标记对照组探针, 用 Cy5-dCTP 标记实验组探针。

2.3 芯片及杂交

Illumina 全基因组表达谱基因芯片 HumanWG-6_v3 BEADCHIP Kit 一张, 含有 48 000 个转录本, 每张芯片可检测 6 个样本。将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 放入杂交箱内杂交过夜 (16~18 h)。洗涤、干燥、扫描等操作均按照说明书进行。

2.4 检测与分析

通过芯片图像分析软件对芯片灰度扫描图进行分析, 可以得到芯片上每个基因点的原始信号值, 即所有有效重复点的前景信号值减去背景信号值 (Avg-signal、Detentionpval、Diffscore 等)。根据这些参数值进行后续的数值分析。差异基因的筛选标准为实验组中基因表达的 Diffscore 值小于 -20 或大于 +20 为差异基因。

3 结果

如果对照组和实验组的检测 P 值都大于 0.01, 则该基因为不可信点, 其余可认为是可信点, 差异基因用 Diffscore 值筛选, Diffscore 绝对值大于 20 为差异表达基因。共发现 306 个差异表达基因, 其

中 220 个表达上调, 86 个表达下调。差异基因 GoTree 分类经过 webgestalt 分析, 差异的 306 个基因中, 共搜索到 267 个, 并在分子功能、生物学过程、细胞组分中形成显著的基因组群。差异基因可分为:

①分子功能类差异基因, 可分为水解酶活性、催化活性、无机二磷酸酶活性、肽抗原结合、镁离子结合、氧化还原磷酸酶活性等相关基因组群。

②生物学过程类差异基因, 可分为固醇生物合成过程、核小体集合、染色质集合、乙醇代谢过程等相关基因组群。

③细胞组分类差异基因, 可分为核小体、蛋白质-DNA 合成、细胞质、溶酶体、细胞内成分等相关基因组群。

部分差异表达较大的基因见表 1。Diffscore 值为正值的为表达上调基因, 负值为表达下调基因。

4 讨论

K562 细胞株具有多向分化潜能, 是目前体外诱导分化实验常用的模型。人参多糖能够诱导 K562 细胞在形态上向成熟红细胞分化, 并伴有血红蛋白含量增加、乳酸脱氢酶活性增强。为探索人参多糖诱导 K562 细胞分化的分子机制, 笔者采用基因芯片技术, 发现人参多糖作用 K562 细胞后, 有 220 个基因表达上调, 86 个基因表达下调。筛选得到的差异表达基因有以下几个特点。

4.1 抑制糖酵解途径关键酶的表达

己糖激酶 (hexokinase, HK) 是糖酵解途径中的第 1 个限速酶, 目前已知人类有 HK-I、HK-II、HK-III 和 HK-IV 4 种同工酶。有研究表明, 与正常细胞比较, 生长迅速的肿瘤细胞中的 HK-II 活力明显增强, 使肿瘤细胞能获得足够的 6-磷酸葡萄糖, 这是在缺氧条件下提供碳源和能源^[4]。丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 是糖酵解的关键酶之一, 主要催化磷酸烯醇式丙酮酸形成丙酮酸并伴有 ATP 的形成, 系 PK 的 M2 型同工酶, 是近年来研究较多的一种新型肿瘤标志物。M2-PK 对底物 ADP 的亲和力大, 使酶活性增强, ATP 失去对糖酵解的调节作用, 从而使糖酵解易于进行, 有利于肿瘤组织的生长, 并且 M2-PK 对 ATP 抑制敏感性低, 不受激素和饮食调节影响, 故可使糖酵解速度失控地增快, 有利于为细胞增殖提供能量。在恶性肿瘤中, 促进糖异生的关键酶活性下降, 而促进糖酵解代谢的增强。因此, PK 活性及同工酶谱的改变在肿瘤

表 1 人参多糖作用 K562 细胞后差异表达的基因

Table 1 Differential expression of gene in K562 cells after treatment with ginseng polysaccharide

基 因	Entrez Gene	Diffscore 值
insulin induced gene 1 (INSIG 1)	3 638	70.811 36
apolipoprotein C-1 (APOC 1)	341	75.088 95
24-dehydrocholesterol reductase (DHCR 24)	1 718	48.179 6
inhibitor of differentiation 3 (ID 3)	3 399	-199.704 1
low density lipoprotein receptor (LDLR)	3 949	80.232 87
serine/threonine kinase 19 (STK 19)	8 859	33.812 95
squalene epoxidase (SQLE)	6 713	37.888 76
apolipoprotein E (APOE)	348	342.230 6
vascular endothelial growth factor (VEGFA)	83 785	-43.123
transmembrane 7 superfamily member 2 (TM7SF 2)	7 108	58.112 66
7-dehydrocholesterol reductase (DHCR 7)	1 717	50.565 44
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR)	3 156	342.230 6
farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (FDFT 1)	2 222	74.957 29
pyruvate kinase, muscle (PKM2), mRNA	5 315	-23.813 73
Homo sapiens hexokinase 2 (HK2), mRNA	3 099	-45.187 8

的发生、发展中具有普遍性。人参多糖作用后 K562 细胞中 HK-II、M2-PK 基因的表达呈现下降的趋势，提示人参多糖可能通过下调该通路相关分子的表达，抑制细胞数量的增加。

4.2 抑制血管内皮生长因子

血管内皮生长因子 (VEGF) 是血小板源性生长因子家族的一个成员，是强有力的内皮细胞有丝分裂原。有研究表明，慢性髓细胞性白血病 (CML) 患者骨髓微血管密度增加^[5]，其血浆 VEGF 水平明显高于正常对照组。Lundberg 等^[6]报道 CML 患者 VEGF 阳性骨髓细胞数明显高于正常对照组并与骨髓血管形成相关。Wieczorek 等^[7]报道 Bcr-abl 阳性细胞分泌 VEGF。在 CML 慢性期患者中亦检出 VEGF 受体。CML 患者骨髓细胞 VEGF 蛋白表达高，对慢性 CML 患者存活有明显影响。人参多糖作用后，K562 细胞 VEGF-A 基因的表达呈下降的趋势，提示人参多糖可能抑制 CML 的血管，抑制肿瘤血管形成，这对抑制肿瘤细胞生长、减少肿瘤复发和转移起重要作用，有一定的应用价值。

4.3 抑制分化抑制因子

分化抑制因子 (inhibitor of differentiation, Id) 是 1990 年 Benezra 等从小鼠肌源细胞中发现的一种基因，其表达产物属于螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 转录因子家族成员。哺乳动物细胞内

有 4 种 Id 分子 (Id1、Id2、Id3 及 Id4)。Id 蛋白具有以下特点：在大多数正常成熟的组织中不表达，在肿瘤细胞和内皮细胞中异常表达；支持血管生成；间接激活一些癌基因，调节肿瘤进程。研究表明，Id 基因并不是普通意义上的癌基因，但 Id 基因的过度表达可以影响许多癌基因的通路^[8]。介导 Id 表达上调的癌蛋白有 Ras、Myc、ETS。Ras 信号激活导致早期生长反应因子 1 (EGF1) 的转录激活，从而诱导 Id1 和 Id3 的表达。实验证明，Id 蛋白过度表达可以改变其他靶基因的活性，从而模拟致癌性激活，该过程被称为致癌性拟态 (oncogenic mimicry)^[9]。AML1-ETO 是由于染色体移位所形成的，可见于 15% 的急性髓性白血病，Id 表达失调可能模拟 AML1-ETO 融合蛋白致癌性的激活。已知这种蛋白质可以诱导造血细胞增殖，促进人造血干细胞的自我更新，抑制多种淋巴造血细胞系的成熟。人参多糖作用后，K562 细胞 Id3 基因的表达呈下降的趋势，提示人参多糖可能对促进 K562 细胞分化起重要作用。

4.4 抑制 DLK1

DLK1 (delta-like-1) 是首先在神经母细胞瘤发现并克隆的基因，属于表皮生长因子超家族成员之一。在多数实体瘤病例中 DLK1 呈高表达，提示 DLK1 可能是一个癌基因^[10]。另有研究显示，DLK1 在许多被 Notch1 调节的细胞分化 (包括造血细胞

的形成, B 细胞、T 细胞的分化) 进程中, 可能是作为一个 Notch1 信号的负调节器参与其中的分子活动^[11]。唐雪元等^[12]通过氯化高铁血红蛋白素(hemin) 诱导 K562 细胞向红系分化, 发现 DLK1 mRNA 的表达随着 K562 细胞向红系分化而逐渐下调, 提示 DLK1 基因在此过程中起重要作用。DLK1 在 K562 细胞红系分化中的作用是否也是通过 Notch1 途径来实现的, 还有待进一步研究。

4.5 抑制细胞增殖相关基因

丝氨酸/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase 19, STK19) 在细胞有丝分裂的早期可与细胞循环控制器 CDC2 蛋白激酶协同发挥抑制有丝分裂的作用, 可能阻断 K562 细胞增殖。

总之, 人参多糖作用后, K562 细胞增殖被抑制, 部分细胞被诱导分化, 这是一个多基因共同参与、协同作用的过程。比较人参多糖作用前后基因表达谱的改变, 深入研究这些差异表达的基因和它们之间的关系, 可揭示 K562 细胞分化过程中肿瘤细胞逆转的分子机制, 为进一步阐明人参多糖治疗白血病提供实验依据。

参考文献

- [1] 黎阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-附 2.
- [2] 陈地龙, 刘永刚, 王亚平, 等. 人参多糖对 K562 细胞增殖抑制及诱导分化的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 517-520.
- [3] 陈地龙, 李静, 刘永刚, 等. 人参多糖对 K562 细胞人粒-巨噬细胞集落刺激因子和促红细胞生成素及其受体表达的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1526-1529.
- [4] Sebastian S, Kenkare U W. Expression of two type II-like tumour hexokinase RNA transcripts in cancer cell lines [J]. *Tumour Biol*, 1998, 19(4): 253-260.
- [5] Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, *et al.* Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2000, 96(6): 2240-2245.
- [6] Lundberg L G, Lerner R, Sundelin P, *et al.* Bone marrow in plocythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(1): 15-19.
- [7] Wiecek A J, Majka M, Curtis L M, *et al.* Bcr-abl-positive cells secrete angiogenic factors including matrix metalloproteinases and stimulate angiogenesis *in vivo* in matrigel implants [J]. *Leukemia*, 2002, 16(6): 1160-1166.
- [8] Stighall M, Manetopoulos C, Axelson H, *et al.* High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(3): 403-411.
- [9] Perk J, Iavarone A, Benezra R, *et al.* Id family of helix-loop-helix proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 603-614.
- [10] Altenberger T, Bilban M, Auer M, *et al.* Identification of DLK1 variants in pituitary 2 and neuroendocrine tumors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(3): 995-1005.
- [11] Sambandam A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(2): 663-670.
- [12] 唐雪元, 龙潺, 王成红, 等. DLK1 在急性白血病中的表达及其在 K562 细胞红系分化中的作用 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2009, 34(9): 886-891.