

家兔体内对小檗碱的药动学研究表明,小檗碱口服能获得有效血药浓度并维持较长时间(AUC 为 211.94 $\mu\text{g/mL}$, C_{max} 为 25.2 $\mu\text{g/mL}$)^[9,10]。本研究应用裸鼠荷人鼻咽癌模型,ig 给予小檗碱 10、30 和 50 mg/kg,连续用药 10 d,其中 30 mg/kg 剂量组的肿瘤体积中位数明显低于对照组($P < 0.05$)。本结果提示小檗碱口服可以达到有效抑瘤的血药浓度。

由于小檗碱的安全性较高,至今在临床上仍然作为常用抗菌药物广泛应用。小檗碱的体内外抗肿瘤活性研究为其单独或者联合其他抗肿瘤药物应用到临床肿瘤化疗方案中提供可能性和理论依据。

References:

- [1] Zhao X Z, Guo X. Clinical survey and myocardial electrophysiology of anti-arrhythmia effects of berberine [J]. *Chin J Cardiol* (中华心血管病杂志), 1989, 17(3): 159-161.
- [2] Xie P Y, Zhou H, Gao Y B. The clinical efficacy of berberine in treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Clin Health Care* (中国临床保健杂志), 2005, 8(15): 402-403.
- [3] Lin J. Inhibitory effects of berberine on growth of K562 cells [J]. *J Fujian Med Coll* (福建医学院学报), 1996, 30(4): 309-312.
- [4] Chi C W, Chang Y F, Chao T W, et al. Flowcytometric analysis of the effect of berberine on the expression of glucocorticoid receptors in human hepatoma HepG₂ cells [J]. *Life Sci*, 1994, 54(26): 2099-2107.
- [5] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2000, 148(1): 19-25.
- [6] Yang I W, Chou C C, Yung B Y. Dose-dependent effects of berberine on cell cycle pause and apoptosis in Balb/c 3T3 cells [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1996, 354(2): 102-108.
- [7] Eastman A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91(2): 223-231.
- [8] Li X K, Motwani M, Tong W, et al. Huanglian, a Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(6): 1287-1293.
- [9] Xiong C Y, Shi X B, Dai Z S, et al. Pharmacokinetic study of ³H-berberine in rabbits and mouse [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1989, 5(5): 293-296.
- [10] Pang Z G, Wang B Q, Jiang H T. Study on the pharmacokinetics of berberine [J]. *J Anal Sci* (分析科学学报), 1997, 13(1): 51-53.

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

陈地龙, 李 静, 刘永刚, 王亚平*, 陈婷梅, 郑 敏, 姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

摘要:目的 研究人参多糖(GPS)对人红白血病细胞株(K562)表达人粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素(EPO)及其受体的影响。方法 采用细胞体外培养技术,RT-PCR 检测 GPS 诱导后 K562 细胞中 GM-CSF、EPO mRNA 的表达、免疫细胞化学方法检测 K562 细胞经 GPS 作用后 GM-CSF、EPO 及其受体蛋白表达的变化、Western blotting 检测 GPS 诱导后 K562 细胞 GM-CSF、EPO 受体蛋白的表达。结果 经 GPS 诱导后,RT-PCR 检测显示 K562 细胞 GM-CSF mRNA 的表达有所增强,但与对照组相比无统计学意义,EPO mRNA 的表达有明显的降低;免疫细胞化学方法检测 EPO 与 GM-CSF 蛋白的表达明显减弱,EPO 与 GM-CSF 受体蛋白的表达明显增强;Western blotting 检测 GM-CSF、EPO 受体蛋白的表达增强。结论 GPS 既能抑制 K562 细胞分泌 GM-CSF、EPO,又能明显促进 GM-CSF、EPO 受体的合成和分泌。

关键词:人参多糖; K562; 造血生长因子

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)10-1526-04

Effect of ginseng polysaccharide on expression of GM-CSF, EPO, and their receptors in K562 cells

CHEN Di-long, LI Jing, LIU Yong-gang, WANG Ya-ping, CHEN Ting-mei, ZHENG Min, JIANG Rong

(Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

收稿日期:2006-01-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670880);重庆市教委资助课题[渝教科(2001)12号]

作者简介:陈地龙(1971—),男,重庆万州人,博士,副研究员,研究方向为造血调控机制。

Tel: (023) 68485614 E-mail: chendilong@21cn.com

*通讯作者 王亚平 Tel: (023) 68485968

Abstract: Objective To study the effect of ginseng polysaccharide (GPS) on the expression of GM-CSF, EPO, and their receptors in K562 cells. **Methods** The expression of GM-CSF and EPO mRNA in K562 cells induced by GPS were detected by RT-PCR; the expression of GM-CSF, EPO, and their receptor proteins in K562 cells induced by GPS were detected by immunocytochemistry, and the expressions of GM-CSF and EPO receptor protein in K562 cells treated by GPS were observed by Western blotting. **Results** The expression of EPO mRNA was weakened; the expressions of GM-CSF and EPO were much weaker and the expressions of their receptor proteins were much stronger in K562 cell induced by GPS. **Conclusion** GPS can not only inhibit K562 cells secretion of GM-CSF and EPO, but also promote the syntheses and secretion of GM-CSF, EPO, and their receptors.

Key words: ginseng polysaccharide (GPS); K562; hematopoietic growth factor

人参是祖国传统医学的“补气”要药,有补气生血之功效,人参多糖 (Ginseng polysaccharide, GPS) 是人参的主要成分之一。前期的研究^[1-3]表明 GPS 能促进正常血细胞生成,并能抑制白血病细胞的增殖,但这种双相调控的机制尚不清楚。本实验在前期研究的基础上,采用实验血液学技术,探讨 GPS 对人红白血病细胞株 (K562) 表达人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的促红细胞生成素 (EPO) 及受体的影响,旨在阐述人参对血细胞发生的调控机制,为研制开发天然中药分化诱导剂提供理论与实验依据。

1 材料

1.1 药品:GPS,重庆中药研究所提供,质量分数 98%,以 RPMI-1640 培养液配制所需浓度,滤过除菌。

1.2 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF):购自北京北医联合生物工程公司,活性 1×10^7 U/mg, RPMI-1640 培养液稀释为 1×10^4 U/mL。

1.3 促红细胞生成素 (EPO):美国 Amgen 公司产品,活性 10^5 U/mL, RPMI-1640 培养液稀释为 100 U/mL。

1.4 人红白血病细胞株 (K562 细胞):本校检验系血液学实验室惠赠,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。

1.5 试剂:RPMI-1640 培养基,美国 Gibco 公司产品;小牛血清 (BS),杭州四季青公司;大鼠抗人 EPO 受体单克隆抗体,晶美生物工程有限公司产品;大鼠抗人 GM-CSF 受体单克隆抗体,美国 Pharmingen 公司产品;Trizol,鼎国生物公司产品;逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP 混合物、DNA 聚合酶, Takara 产品;DAB 试剂盒,北京中山生物技术有限公司产品;K562 细胞总 RNA 抽提试剂: Trizol Isolation Reagent,上海申能博彩生物科技有

限公司产品;逆转录合成 cDNA 相关的试剂: MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒,上海生工生物工程技术服务有限公司;PCR 扩增相关的试剂: PCR 扩增试剂盒,华宝生物工程有限公司;pUC19 DNA 相对分子质量标准 (DNA Maker, 成分:501/498、404、331、242、190、147、111/110、67、34/34 bp):上海复华实业股份有限公司。

2 方法

2.1 GPS 诱导后 K562 细胞 GM-CSF、EPO mRNA 表达检测:取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养。对照组:常规培养;GPS 组:培养体系中加入 GPS (本室既往的研究表明随着加入 GPS 质量浓度的增加和培养时间的延长,对 K562 细胞的增殖抑制作用越明显,根据 MTT 方法分析,确定 $40 \mu\text{g/mL}$ 为最适药物质量浓度^[4]),每组设 3 个复孔,置 37°C 、5% CO_2 的孵箱中培养,在培养第 6 天取样, RT-PCR 检测 K562 细胞中 GM-CSF、EPO mRNA 表达。

2.1.1 总 RNA 提取:所有器具均经 DEPC 浸泡处理,并灭菌。取 K562 细胞,用 DEPC 处理过的冰冷 PBS 洗涤 2 次;每 1×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol, Trizol 法提取 RNA, 28 S、18 S 两条带清晰, $A_{260}/A_{280}=1.840$, RNA 置于 -70°C 待用。

2.1.2 逆转录反应 (RT):从 -70°C 取出 RNA 进行反应。参数: 30°C 、10 min, 42°C 、30 min, 99°C 、5 min, 5°C 、5 min。

2.1.3 PCR 引物序列: EPO, 上游引物: $5'$ GGCCCTGTTGGTCAACTCT $3'$, 下游引物: $5'$ CCGGAGGAAATTGGAGTAGAC $3'$; GM-CSF, 上游引物: $5'$ GAGCCGACCTGCCTACCAGA $3'$, 下游引物: $5'$ GCAGTCAAAGGGGATGACAAG $3'$; 参数: 94°C 预变性 5 min, 94°C 、30 s, 55°C 、30 s, 72°C 、1 min, 30 次循环, 72°C 延伸 10 min。

2.2 GPS 诱导后 K562 细胞 GM-CSF、EPO 及相

关受体蛋白表达检测:取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养,对照组:常规培养;GPS 组:培养体系中加入 GPS (终质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。分别在培养第 3、6 天取各组 K562 细胞,PBS 洗涤后离心甩片,以大鼠抗人 EPO、GM-CSF、EPO 受体、GM-CSF 受体单克隆抗体进行免疫细胞化学 SP 法染色。图像分析仪计数每例 300 个细胞,计算阳性细胞表达率。

2.3 Western blotting 法检测 GPS 诱导后 K562 细胞胞浆中 GM-CSF、EPO 受体的表达:取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养。对照组:常规培养;GPS 组:培养体系中加入 GPS (终质量浓度为 1、10、40、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。分别在培养第 6 天收集 K562 细胞。分别提取各组 1×10^7 个细胞的胞浆蛋白和核蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,实验中求得的直线回归方程为: $Y = 36.112 X - 1.6767$ ($r = 0.9966$, Y 为蛋白量, X 为吸光度值)。变性不连续 SDS-PAGE,然后将蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜(电转移法),显现固定于硝酸纤维素滤膜上的抗原,进行 Western blotting 检测。将晾干后的 NC 膜用 Microtec ScanMaker E6 系统扫描,ImageMaster VDS Software2.0 测定各显色条带的绝对吸光度(A)值,计算每 μg 蛋白对应的 A 值,结果以 A 值/ μg 蛋白表示。

2.4 统计学处理:用 SAS 统计软件进行方差分析,秩和检验等。

3 结果

3.1 GPS 诱导后 K562 细胞 GM-CSF、EPO mRNA 表达:GPS (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 K562 细胞 6 d,通过 RT-PCR 技术检测 GM-CSF、EPO mRNA。结果显示:与对照组相比,经 GPS 诱导后的 K562 细胞,GM-CSF mRNA 的表达有所增强,但与对照组相比无统计学意义;EPO mRNA 的表达有明显的降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 GPS 对 K562 细胞 GM-CSF 和 EPO mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of GPS on expression of GM-CSF and EPO mRNA in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	GM-CSF mRNA	EPO mRNA
对照	—	173.9 $\pm$ 13.3	191.5 $\pm$ 17.1
GPS	40	195.8 $\pm$ 12.4	158.2 $\pm$ 12.6*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 GPS 诱导 K562 细胞 GM-CSF、EPO 蛋白表达:GPS (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 K562 细胞 3、6 d,通过

免疫细胞化学检测 EPO、GM-CSF 的蛋白表达。结果显示:与对照组相比,经 GPS 诱导后,K562 细胞的 EPO 与 GM-CSF 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 GPS 对 K562 细胞 EPO 和 GM-CSF 及其受体蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of GPS on expression of EPO and GM-CSF, and their receptor protein in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	作用时间/ d	阳性率/%		EPO	GM-CSF
		EPO 蛋白	GM-CSF 蛋白	受体蛋白	受体蛋白
对照	—	89.12 $\pm$ 9.66	87.89 $\pm$ 8.76	26.56 $\pm$ 6.18	16.67 $\pm$ 4.52
GPS	3	78.32 $\pm$ 3.13	71.73 $\pm$ 8.53	69.67 $\pm$ 7.23*	87.19 $\pm$ 9.16**
	6	37.45 $\pm$ 4.08**	21.82 $\pm$ 6.53**	78.87 $\pm$ 11.23**	91.59 $\pm$ 13.88**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

3.3 GPS 诱导 K562 细胞后 GM-CSF、EPO 受体蛋白的表达:GPS (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 K562 细胞 3、6 d,通过免疫细胞化学检测 EPO 及 GM-CSF 受体蛋白表达。结果显示:与对照组相比,经 GPS 诱导后 K562 细胞的 EPO 与 GM-CSF 受体蛋白表达明显增强 ($P < 0.01$)。见表 2。

GPS (1、10、40、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 诱导 K562 细胞 6 d 后,通过 Western blotting 检测 GM-CSF 及 EPO 受体蛋白。结果显示:与对照组相比,经 10、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GPS 诱导后的 K562 细胞胞浆中 EPO 受体蛋白表达增强,但 GPS 的终质量浓度需达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,GM-CSF 受体蛋白的表达才明显增强。见表 3。

表 3 Western blotting 检测 GPS 对 K562 细胞胞浆中蛋白 GM-CSF 和 EPO 受体蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of GPS on expression of GM-CSF and EPO receptor protein in plasma of K562 cells detected by Western blotting ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	胞浆中受体蛋白表达/(A $\cdot \mu\text{g}^{-1}$)	
		GM-CSF	EPO
对照	—	0.52 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.08
GPS	1	0.63 $\pm$ 0.14	0.32 $\pm$ 0.07*
	10	0.69 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.11*
	40	0.64 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.03*
	100	0.93 $\pm$ 0.17**	0.26 $\pm$ 0.05

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

造血生长因子(hematopoietic growth factor, HGF)通过复杂的细胞因子网络,在造血调控中发挥重要作用。现代血液学研究证明:HGF 与造血细

胞膜上相应的受体结合,启动造血调控信号的传导,最终通过基因表达的产生调节细胞的增殖与分化。髓系白血病是克隆性疾病,恶性祖细胞在其增殖及自我更新的过程中也受 HGF 调控,但 HGF 在白血病发病机制中的作用及在白血病临床应用方面尚有不同观点^[5,6]。HGF 对大多数髓系白血病细胞具有促增殖效应,而无明显诱导分化作用。早期认为 HGF 在体内有两方面生物学作用^[7]:(1)激活相应的特异性受体产生一个有丝分裂信号,导致细胞增殖;(2)通过对其他细胞刺激因子受体的调节而使其激活,导致细胞分化成熟。某些白血病细胞株(如 K562)表达高亲和力的 GM-CSF、白细胞介素 3 (IL-3) 受体。GM-CSF、EPO 通过其受体引起信息传递途径中某些蛋白激酶的酪氨酸和丝氨酸磷酸化使细胞得以增殖,进一步的研究发现,对单位剂量生长因子来说,细胞有高亲和力的 HGF 受体,并不一定表示细胞对相应细胞生长因子产生增殖反应。

GPS 是人参“补气生血”或促进血细胞发生的有效成分之一。GPS 能促进小鼠造血干/祖细胞的增殖分化^[8~12]。K562 细胞与正常人多向性造血祖细胞的生物学特征相似,既往的研究表明,GPS 可以诱导 K562 细胞向粒系、红系成熟方向分化^[4],但 GPS 诱导 K562 分化与造血生长因子及相关受体的关系尚不清楚。

研究表明白血病细胞可以自分泌 HGF,使其大量增殖,而不能促进其诱导分化成熟。本实验结果显示:GPS 诱导 K562 细胞表达 EPO mRNA 的水平与对照组相比有所降低,但对 K562 细胞表达 GM-CSF mRNA 无明显影响;免疫细胞化学检测表明 GPS 诱导 K562 细胞表达 GM-CSF、EPO 蛋白明显降低,这提示 GPS 能从基因转录水平和蛋白表达水平两个层次抑制 K562 细胞分泌 GM-CSF、EPO (HGF),从而抑制细胞的增殖。

HGF 与其受体结合,启动一系列信号转导途径是造血细胞分化成熟的关键,因此探讨 HGF 受体的数量与活性可以反映 GPS 诱导白血病细胞分化的分子机制。本研究结果表明:GPS 诱导 K562 细胞后,表达 GM-CSF、EPO 的受体均出现明显的增加,这表明 GPS 能促进 K562 细胞表达 GM-CSF、EPO 受体,这可能与 GPS 促进 K562 细胞向粒系、红系细胞分化有着密切关系。

综上所述,GPS 诱导 K562 细胞向成熟方向分

化,是通过抑制白血病细胞自分泌 GM-CSF、EPO 等细胞因子以及促进其细胞因子受体的表达,而抑制白血病细胞增殖,促进白血病细胞分化。推测 GPS 是通过抑制 K562 细胞分泌细胞因子,但可促进 K562 细胞表达有关细胞因子受体,细胞因子与相关受体结合,激活信号转导途径,促进 K562 细胞向成熟方向分化。

References:

- [1] Chen D L, Wang Y P, Chen T M. Effects of TSPG combined with EPO or GM-CSF on differentiation of K562 cells [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2003, 25(22): 2018-2021.
- [2] Dui Q, Wang Y P, Zhou K S, et al. The effect of Ginseng polysaccharide on proliferation of human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) [J]. *Acta Univ Sci Med Chongqing* (重庆医科大学学报), 2001, 26(2): 126-129.
- [3] 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.
- [4] Chen D L, Liu Y G, Wang Y P, et al. Effects of Ginseng polysaccharide on proliferation and differentiation of K562 cells [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2005, 27(6): 517-520.
- [5] Ram P A, Waman D J. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(50): 35553-35561.
- [6] Touw L, Van Gorp R, Schipper P, et al. Introduction of the human interleukin-6 (IL-6) receptor in murine IL-3-dependent hematopoietic cells restores responsiveness to IL-6 [J]. *Blood*, 1992, 79: 2867-2872.
- [7] Xie J Y. Hematopoietic growth factor and acute myelocytic leukemia [J]. *Foreign Med Sci, Blood Transfus Hematol* (国外医学:输血与血液学分册), 1998, 21(1): 54-57.
- [8] Wang Y, Wang Y P, Zhu P D. Effect of total saponins of *Panax ginseng* on the proliferation of mice hematopoietic cell [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 1995, 18(2): 153-156.
- [9] Wang Y, Zhu P D, Wang Y P. Study on the mechanism of total saponins of *Panax ginseng* stimulate mice hematopoiesis in vitro [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1995, 16(12): 648-649.
- [10] Jiang R, Wang Y P, Dai Q. In situ fixation and stain identification of human CFU-GM [J]. *Chin J Histochem Cytochem* (中国组织化学与细胞化学杂志), 2000, 9(3): 344-346.
- [11] Wang Y P, Wang Y, Zheng M, et al. Detection of GM-CSF mRNA expression with digoxigenin labeled cDNA probe [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 1999, 15(4): 266-269.
- [12] 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), 1999, 30(4): 362-365.