inhibitors from the macroalgal extracts [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2002(2): 8-11.

[3] Zhang L X, Hang H, Lu M S, *et al*. The preliminary studies of phenols *in Polysiphonia* [J]. *J Qingdao Univ* (青岛大学学报), 1999, 12(3): 82-85.

[4] Huang Z, Ma J, Yuan A H, *et al*. Isolation and screening of glucosidase inhibitors from Chinese medicines [J]. *J Med Coll PLA* (军医大学学报), 2004, 19(2): 108.

[5] Miller D, Crane R K. The digestive function of the epithelium of the small intestine. Ⅰ. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush borderportion of intestinal epithelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1961, 52: 293-298.

[6] Fu Y, Hu B R, Tang Q, *et al*. Effect of jatrorrhizine, berberine, Huanglian Decoction and compound-mimic prescription on blood glucose in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 549-551.

[7] Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, *et al*. Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and fao hepatoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (13): 10207-10211.

[8] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, *et al*. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene [J]. *Science*, 1999, 283: 1544-1548.

人参总皂苷对人慢性粒细胞性白血病 K562 细胞 Fas、sFas 和 FasL 的影响

陈婷梅[1]，张 健[2]，曹唯希[1]，姜 容[3]，王亚平[3]

(1. 重庆医科大学 医学检验系临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室，重庆 400016；2. 重庆医科大学组织胚胎学教研室，重庆 400016；3. 重庆医科大学附属第一医院，重庆 400012)

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 是祖国医学“补气”要药，人参总皂苷 (total saponins of *Panax ginseng*, TSPG) 是其主要有效部位。既往研究已经证明 TSPG 既能促进造血干/祖细胞增殖分化及其信号转导，诱导造血生长因子基因表达[1]，又能诱导白血病细胞凋亡和向较成熟细胞分化[2,3]。诱导细胞凋亡的信号和转导途径多种多样，其中 Fas-FasL 途径属于死亡因子及其受体介导的信号转导途径。本实验就 TSPG 诱导人慢性粒细胞性白血病 K562 细胞凋亡的信号转导机制进行探讨，旨在为研究 TSPG 治疗白血病等肿瘤的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物：TSPG 购自重庆中药研究所，质量分数 95% 以上，用 RPMI-1640 液配成所需浓度。

1.2 细胞株：人慢性粒细胞性白血病细胞株 K562 细胞，由本室保存，用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液常规传代培养。

1.3 试剂与仪器：RPMI-1640 培养基，美国 Gibco 公司产品；小牛血清购自杭州四季青公司。小鼠抗人 Fas、FasL 单克隆抗体、可溶性 Fas (soluble Fas, sFas) 检测 ELISA 试剂盒由 The Scripps Research Institute (San Diego) 罗云萍博士惠赠，SP 染色组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞处理[2]：取对数生长期 K562 细胞，使终浓度为 1×10^5/mL。实验组培养体积中加入 100 μg/mL TSPG；对照组加等量的 RPMI-1640 培养液。分别培养 3、6、9 d，取样测定。

1.4.2 TSPG 对 K562 细胞 Fas 表达的影响：取对照组和实验组细胞，PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次后，离心甩片；加入过氧化物酶阻断剂，室温 10 min；加封闭血清，室温 15 min，再加小鼠抗人 Fas 单克隆抗体 (工作浓度分别为 1∶200)，4 ℃ 过夜；取出洗涤 3 次，加链亲和素-过氧化物酶；再加新鲜配制的 DAB 溶液，用水冲洗，苏木素复染，待干镜检，同时设立不加一抗 (以 PBS 代替) 的阴性对照；图像分析仪计数每例 300 个细胞，计算阳性表达率。

1.4.3 TSPG 对 K562 细胞 FasL 表达的影响：取对照组和实验组细胞，同上处理细胞进行免疫细胞化学染色，小鼠抗人 FasL 单克隆抗体工作浓度为 1∶100，同时设立不加一抗的阴性对照组，图像分析仪计数每例 300 个细胞，计算阳性表达率。

1.4.4 TSPG 对 K562 细胞培养上清液中 sFas 水

收稿日期：2006-09-08

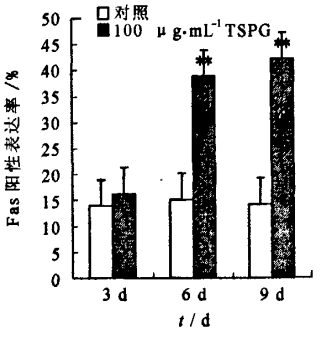
作者简介：陈婷梅 (1969—)，女，重庆市人，博士，副教授，主要研究方向为肿瘤细胞逆转、分化和凋亡及其机制的研究。
Tel：(023) 68485725(O) E-mail：chentingmei@sohu.com

平的影响：采用 ELISA 双抗体夹心法测定细胞培养上清液中 sFas。收集培养 3、6、9 d 的实验组和对照组细胞培养上清液，−20 ℃ 保存备用；操作按试剂盒说明书进行，于酶标仪 450 nm 处读取吸光度（A）值，用 sFas 标准品绘制标准曲线，在曲线上用所测得的标本 A 值求得相应的 sFas 质量浓度。

1.5 统计学处理：用 SAS 统计软件进行方差分析、秩和检验等。

2 结果

2.1 TSPG 对 K562 细胞 Fas 表达的影响：Fas 在对照组 K562 细胞有一定表达，100 μg/mL TSPG 作用 6、9 d，K562 细胞的 Fas 阳性表达率均有所升高，与对照组相比有统计学意义（$P<0.01$），结果见图 1。



与对照组比较：**$P<0.01$

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

图 1 TSPG（100 μg/mL）对 K562 细胞 Fas 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 1 Effect of TSPG (100 μg/mL) on expression of Fas of K562 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.2 TSPG 对 K562 细胞 FasL 表达的影响：100 μg/mL TSPG 作用 K562 细胞 3、6、9 d，实验组与对照组 FasL 表达差异无显著性，见图 2。

2.3 TSPG 对 K562 细胞培养上清液中 sFas 水平的影响：在 9 d 的观察时间内，实验组与对照组 sFas 水平无明显变化，见图 3。

3 讨论

前期研究表明 TSPG（50、100、200 μg/mL）作用于 K562 细胞 3、6、9 d 可诱导细胞发生凋亡[2]，并依此确定本实验 TSPG 作用质量浓度为 100 μg/mL。

诱导细胞凋亡的信号和转导途径多种多样，其中 Fas-FasL 途径属于死亡因子及其受体介导的信号转导。Fas（CD95）为死亡受体家族成员，是 I 型膜蛋白；当 Fas 与相应配体 FasL（CD95L）结合

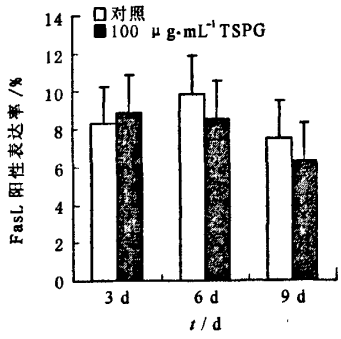


图 2 TSPG（100 μg/mL）对 K562 细胞 FasL 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 2 Effect of TSPG (100 μg/mL) on expression of FasL of K562 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

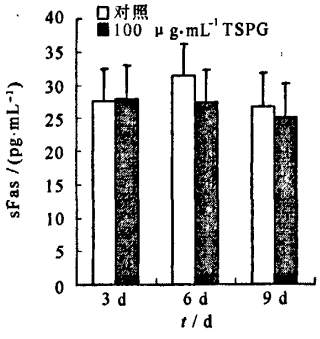


图 3 TSPG（100 μg/mL）对 K562 细胞 sFas 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 3 Effect of TSPG (100 μg/mL) on sFas level of K562 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

后，Fas 受体三聚化而活化，激活的受体与 FADD 结合，再与 caspase-8 相互作用使后者激活，最终启动 caspases 家族级联反应而导致细胞凋亡。Fas 在一些组织中有丰富的表达，有研究资料显示 Fas 几乎可在各种白血病细胞表达[4]；用 Fas 单抗并不能诱导所有 Fas 阳性细胞凋亡，说明这些白血病细胞可能存在着抗凋亡机制；也有研究表明 Fas 基因转染 HL-60 细胞后，细胞对 rhG-CSF 更敏感，凋亡率更高，从而证实 Fas 是一诱导凋亡基因[5,6]。FasL 则主要分布在激活的 T 细胞、NK 细胞和在免疫赦免区如眼、睾丸中表达[7,8]。新近研究发现 FasL 在一些型别的白血病细胞和身体其他组织上也有表达[9]。一般认为，白血病细胞表面高水平的功能性 FasL，可能在白血病发病过程中杀死 Fas 阳性的免疫细胞，从而产生“免疫逃逸”作用[10]；但也有资料显示某些化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡的机制是导致 FasL 表达增加。因此，目前对于 Fas、FasL 在细胞凋亡中的作用有不同的观点。此外，由于 Fas 和

FasL 均可从细胞膜上脱落形成可溶形式的 sFas、sFasL，当 sFas 与 FasL 结合后，抑制相应受体效应(Fas-FasL) 从而抑制细胞凋亡作用[9]，而 sFasL 具有与膜 Fas (mFas) 同样生物学作用，可引起细胞凋亡。

本实验发现未用药处理的对照组 K562 细胞 Fas 阳性表达率为 (13.93±2.56)%，100 μg/mL TSPG 诱导 K562 细胞凋亡时，Fas 阳性表达率升高，由此可推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与上调细胞 Fas 表达有关；另一方面，对照组 K562 细胞 FasL 阳性表达率为 (8.65±0.8)%；在 100 μg/mL TSPG 作用 K562 细胞 9 d 中，实验组与对照组 FasL 表达差异无显著性。根据以上实验结果，推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能机制为：①TSPG 诱导 K562 细胞表达 Fas，Fas 直接导致细胞凋亡，即 Fas 阳性细胞自杀的结果。②在体外 K562 细胞培养体系中，虽然 TSPG 不能使 K562 细胞表达 FasL 的阳性细胞升高，但考虑到仍有部分 K562 细胞 FasL 阳性，也可通过相邻细胞膜表面 Fas 与 FasL 结合而相互残杀，从而导致细胞凋亡。③有文献报道急性白血病细胞可自分泌肿瘤坏死因子 (TNF)[11]，是否 Fas 阳性细胞对自分泌 TNF 敏感而促进细胞凋亡，这需要进一步研究。

此外，本实验还分析了 100 μg/mL TSPG 诱导 K562 细胞凋亡时，细胞培养上清液中 sFas 的变化情况，结果显示在 9 d 的观察时间内，实验组与对照组 sFas 水平无明显变化。由此可初步推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与细胞 Fas 升高及其所产生的受体效应有关，而与 sFas 作用无关。

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 factor [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1990, 30(4): 362-366.

[2] Chen T M, Wang Y P, Chen D L, *et al*. Experimental study on effect of apoptosis of K562 cells treated with TSPG [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(3): 235-237.

[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] Komada Y, Sakurai M. Fas recepter (CD95)-mediated apoptosis in leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 1997, 25(1-2): 9-21.

[5] Nagatas. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 267: 1449-1455.

[6] Song Y Q, Xu G L, Zhang L Y, *et al*. Transfection of Fas gene into HL-60 cell and its role in rhG-CSF-induced apoptosis [J]. *Chin J Hematol* (中华血液学杂志), 1999, 20(5): 242-244.

[7] Bellgrau D, Gold D, Selawry H, *et al*. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection [J]. *Nature*, 1995, 377(6550): 630-632.

[8] Stauart P M, Griffith T S, Usui N, *et al*. CD95 Ligand (FasL) induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(3): 396-402.

[9] Feng X Q, Zhou S Y. The expression of apoptotic factor Fas ligand in acute leukemia [J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2000, 19(9): 911-913.

[10] Li A X, Zou P, Wang L L, *et al*. Study on expressin and function of Fas ligand in human myeloid leukemia cells [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2002, 10(3): 183-186.

[11] Luo Y P, Huang Z G. Modulation and significance of IL-6 and TNF on leukemic cells [J]. *Shanghai J Immunol* (上海免疫学杂志), 1996, 16: 169-171.

樟芝菌粉对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用

陆震鸣，敖宗华*，陶文沂，邹锡良，符慧子

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214036)

樟芝 *Antrodia camphorata* (M. Zang & C. H. Su) Sheng H. Wu, Ryvaden & T. T. Chang，又名牛樟菇、牛樟芝，是一种寄生于台湾特有树种——牛樟树腐朽内壁的多孔菌[1]。在民间，樟芝长久以来被用来治疗食物、酒精和药物所引起的中毒，以及腹泻、腹痛、高血压、乙型肝炎[2]、肝癌[3]和抗氧化[4]等。有研究证实樟芝发酵液对四氯化碳所诱发的肝损伤也有很好的预防和治疗作用[5,6]，多糖、三萜类化合物和酚类物质被认为是樟芝中主要的活性成分。本实验采用大鼠急性乙醇性肝损伤模型来评价樟芝菌粉的保肝作用。

1 材料

收稿日期：2006-08-27

作者简介：陆震鸣(1981—)，男，江苏无锡人，硕士研究生，研究方向为天然生物活性物质的药物化条件的研究。Tel：(0510) 85862938

*通讯作者 敖宗华 Tel：(0510) 85862412 E-mail：azh2003@sytu.edu.cn