

# 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗白血病多药耐药细胞 K562/VCR 作用研究

徐晓军, 石淑文\*, 汤永民, 沈红强, 钱柏芹

(浙江大学医学院附属儿童医院 血液肿瘤科, 浙江省新生儿疾病诊治重点实验室, 浙江 杭州 310003)

**摘要:**目的 通过观察人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对人白血病多药耐药 (MDR) 细胞 K562/VCR 生长、凋亡的作用和逆转耐药的情况, 探索该药在抗人白血病 MDR 方面的应用价值。方法 将人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 与 K562、K562/VCR 细胞共培养 48 h 后采用 MTT 法分析其对细胞生长的抑制率; 将其与 K562/VCR 细胞于 37 °C 孵育 30 min 后, 采用 Annexin V 和 PI 双染法在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况; 并观察其对 K562/VCR 细胞摄取柔红霉素 (DNR) 能力及细胞表面 P 糖蛋白 (P-gp) 表达的影响; 在 DNR 与 K562/VCR 培养体系中加入不同质量浓度人参皂苷 Rh<sub>2</sub>, 孵育 48 h 后观察人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562/VCR 细胞耐药的逆转情况。结果 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可明显抑制 K562 和 K562/VCR 细胞的生长, 并呈量效关系, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562 和 K562/VCR 的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 44.5、59.4 μg/mL。K562/VCR 经人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 在 37 °C 作用 30 min 后, 细胞的凋亡明显增加, 随人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 质量浓度的增加, 凋亡细胞的比例明显增加 [人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 300 μg/mL, Annexin V<sup>+</sup> 细胞 (51.5±6.9)%]。K562 细胞经长春新碱 (VCR) 诱导耐药后, P-gp 表达率明显提高 (从 4.28% 到 93.80%), DNR 摄取率减少, 25 μg/mL 以上质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 即可明显提高 K562/VCR 对 DNR 的摄取, 但 P-gp 的表达无明显改变。同时, 它可明显提高 DNR 对 K562/VCR 的杀伤率, 50 μg/mL 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可使 K562/VCR 对 DNR 的敏感性提高到原来的 6.30 倍。结论 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 能抑制 K562/VCR 细胞生长, 诱导其凋亡, 还可以逆转 K562/VCR 的耐药, 是一种具有广阔开发前景的抗白血病药物。

**关键词:** 人参皂苷 Rh<sub>2</sub>; 多药耐药; 白血病; K562/VCR 细胞

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1131-05

## Therapeutic effects of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on multi drug resistant leukemia cell line K562/VCR

XU Xiao-jun, SHI Shu-wen, TANG Yong-min, SHEN Hong-qiang, QIAN Bai-qin

(Zhejiang Key Laboratory for Diagnosis and Therapy of Neonatal Diseases, Division of Hematology-oncology, Children's Hospital of Zhejiang University, School of Medicine, Hangzhou 310003, China)

**Abstract: Objective** To study the therapeutic effects and their mechanisms of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on multi drug resistance of (MDR) leukemic cells by observing the effects of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on proliferation, apoptosis, and resistance to Vincristine (VCR) of human erythroleukemia cell line K562/VCR. **Methods** First, ginsenoside Rh<sub>2</sub> with different concentration was co-cultured with K562 and K562/VCR cells in 96 wells cell culture plates. The inhibitory rates and 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) were determined and calculated 48 h later by MTT assay. Second, ginsenoside Rh<sub>2</sub> with different concentration was co-cultured with K562/VCR cells in water bath at 37 °C for 30 min, then the apoptosis rates were examined by Annexin V/PI apoptosis kit on flow cytometry. Third, ginsenoside Rh<sub>2</sub> with different concentration was co-cultured with K562/VCR cells in water bath at 37 °C for 30 min followed by adding Daunorubicin (DNR) after washing with PBS. The intake of DNR and the expression of P-glycoprotein (P-gp) were analyzed 30 min later on flow cytometry. Finally, ginsenoside Rh<sub>2</sub> with different concentration was co-cultured with K562/VCR cells in 96 well cell culture plates, which were then treated by DNR. The inhibitory rates and reverse effects were evaluated 48 h later by MTT assay. **Results** K562 and K562/VCR cells' growth were obviously inhibited by ginsenoside Rh<sub>2</sub> in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub> values of K562 and K562/VCR were 44.5 and 59.4 μg/mL, respectively. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> could induce apoptosis of K562/VCR [Rh<sub>2</sub> 300 μg/mL, Annexin V<sup>+</sup> cell (51.5±6.9)%]. The apoptosis rate of K562/VCR increased in accordance with the rise of ginsenoside Rh<sub>2</sub> concentration. The expression of P-gp increased (4.28% to 93.80%) and the intake of DNR decreased when K562 was resistant to VCR. However, ginsenoside Rh<sub>2</sub> with a concentration of 25 μg/mL or higher could greatly enhance the intake of DNR. The inhibitory effects of DNR

\* 收稿日期: 2009-11-12

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2005C168); 浙江省教育厅科研项目 (20061263)

作者简介: 徐晓军 (1981-), 男, 浙江龙游人, 博士, 研究方向为儿童白血病诊断与治疗。

Tel: (0571) 87061007-32460 E-mail: xuxiaojun@zju.edu.cn

\* 通讯作者 石淑文 E-mail: sswhz@126.com

on K562/VCR could be greatly increased by Rh<sub>2</sub>. The reverse index was 6.30 when Rh<sub>2</sub> concentration was 50 μg/mL. **Conclusion** Ginsenoside Rh<sub>2</sub> could inhibit the growth, induce the apoptosis, and reverse the MDR of K562/VCR. It could be an excellent anti-leukemic agent.

**Key words:** ginsenoside Rh<sub>2</sub>; multi drug resistance (MDR); leukemia; K562/VCR cells

多药耐药 (MDR) 是肿瘤化疗失败及肿瘤复发的重要原因。目前, 至少已发现 13 种与 MDR 相关的 ATP 结合盒转运体, MDR P-糖蛋白 (简称 P-gp) 是其中最重要的一员<sup>[1]</sup>。维拉帕米、环孢霉素等常见的耐药逆转剂, 由于正常血药浓度难以达到疗效或明显的不良反应而在应用上受到限制。某些天然黄酮类化合物可逆转肿瘤细胞的 MDR<sup>[2]</sup>。人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 是从红参中提取的天然成分, 研究表明其可以抑制小鼠黑色素瘤、胶质瘤及人肝癌、乳腺癌等肿瘤细胞的增殖, 促进其凋亡, 逆转 P-gp 介导的细胞耐药<sup>[3~5]</sup>。但人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对人白血病细胞的作用有关资料尚不完善<sup>[6,7]</sup>。本实验主要通过观察人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对人白血病 MDR 细胞 K562/VCR 生长、凋亡的作用和逆转耐药的情况, 探索该药在抗人白血病 MDR 方面的应用价值。

## 1 材料

1.1 药物、试剂与仪器: 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 为大连生生绿谷生物工程公司生产, 质量分数 > 98%, 溶于甲醇, 制得 20 mg/mL 母液备用; 柔红霉素 (DNR) 为意大利法玛西亚制药公司生产; PE 标记 P-gp 鼠抗人单克隆抗体购自美国 BD 公司; RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所; MTT 购自美国 Ameresco 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究; ELx-800 型酶标仪为美国 BioTEK 产品; 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 细胞株: K562 细胞购自美国 ATCC 公司, K562/VCR 为本实验室自行诱导建株<sup>[8]</sup>。

## 2 方法

2.1 对细胞生长的抑制作用: 取对数生长期 K562 和 K562/VCR 细胞制成细胞悬液, 调节浓度至  $5 \times 10^5$  /mL, 按每孔 100 μL 的体积接种于 96 孔培养板, 培养 12 h 后分别加入一定体积的 40、80、120、160、200 μg/mL 的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 溶液 100 μL (将 20 mg/mL 的母液溶于 RPMI 1640 培养基中制备而成), 各孔总体积均为 200 μL, 使其质量浓度分别为 20、40、60、80、100 μg/mL。每一质量浓度均设 6 孔, 同时设有对照孔和调零孔。在加药 48 h 后采用

MTT 比色法检测各孔在 570 nm 波长下的吸光度 (A) 值, 计算人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562 和 K562/VCR 细胞生长的抑制率: 抑制率 =  $(1 - \text{给药孔平均 } A \text{ 值} / \text{对照孔平均 } A \text{ 值}) \times 100\%$ 。根据不同质量浓度下的抑制率绘制量效曲线, 由此计算出半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

2.2 促进细胞凋亡实验: 取对数生长期 K562/VCR 细胞制成细胞悬液, 调节细胞浓度至  $5 \times 10^5$  /mL, 按每管 0.95 mL 加至 1.5 mL 离心管中。各管分别加入质量浓度 1、2、4、6 mg/mL 的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 溶液 50 μL (对照组加入 PBS 50 μL), 使其终质量浓度分别为 50、100、200、300 μg/mL, 每个质量浓度组设 4 个复孔。37 °C 水浴中孵育 30 min 后采用 Annexin V 和 PI 双染法在流式细胞仪上检测细胞凋亡情况。

2.3 对 K562 和 K562/VCR 细胞摄取 DNR 的影响: 取对数生长期 K562 和 K562/VCR 细胞制成细胞悬液, 调节细胞浓度至  $5 \times 10^5$  /mL, 按每管 0.95 mL 加至 1.5 mL 离心管中。各管分别加入质量浓度 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 溶液 50 μL (对照组加入 PBS 50 μL), 使其终质量浓度分别为 25、50、75、100 μg/mL, 每个质量浓度组设 4 个复孔。37 °C 水浴中孵育 30 min, 洗涤后加入 1 μg/mL 的 DNR 溶液 1 μL, 37 °C 水浴中再孵育 30 min, 然后通过流式细胞术检测 K562/VCR 细胞内 DNR 的量和细胞表面 P-gp 表达的变化情况。

2.4 对 K562/VCR 细胞耐药的逆转实验: 取对数生长期 K562/VCR 细胞制成细胞悬液, 调节浓度至  $5 \times 10^5$  /mL, 按每孔 150 μL 的体积接种于 96 孔培养板, 培养 12 h 后处理组分别加入质量浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/mL 的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 溶液 50 μL (对照组和 DNR 组分别加入 PBS 50 μL), 各孔总体积均为 200 μL, 使其终质量浓度分别为 12.5、25、50 μg/mL。人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 各质量浓度组及 DNR 组加入 0.2 mmol/L DNR 溶液 1 μL, 使 DNR 的终质量浓度为 0.5 μg/mL, 对照组不加 DNR。每一质量浓度均设 6 孔, 同时设调零孔。在加药 48 h 后采用 MTT 比色法检测各孔在 570 nm 波长下的 A 值, 计算人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562/VCR 细胞生

长的抑制率和耐药的逆转倍数。

逆转倍数 = 药物处理组抑制率 / DNR 组抑制率

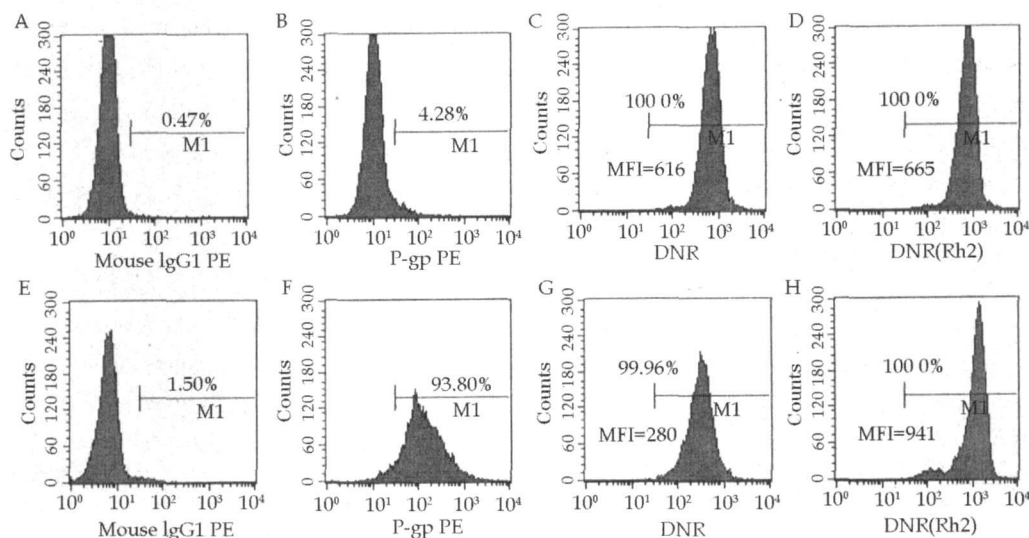
2.5 统计学处理: 数据分析采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。采用 Probit 法计算  $IC_{50}$ , 所有统计均在 SPSS 12.0 统计软件上进行。

### 3 结果

#### 3.1 K562 与 K562/VCR 细胞生物学特性的比较:

K562/VCR 细胞株是本实验室采用反复短期暴露

法, 将 K562 细胞与不同浓度的长春新碱 (VCR) 共培养 90 d 左右制备而成。通过对 K562 细胞与 K562/VCR 细胞的比较可发现, 两者在形态上并无明显差别, 但 K562/VCR 细胞的 P-gp 表达明显上调 (阳性率分别为 4.28%、93.80%), 1  $\mu\text{g/mL}$  DNR 分别与 K562 和 K562/VCR 孵育 30 min 后, 通过流式细胞术分析显示耐药细胞的 DNR 的摄取率低于非耐药细胞 [平均荧光强度指数 (MFI) 分别为: 280、616], 见图 1。



A~D-K562 细胞 E~H-K562/VCR 细胞 A、E 为阴性对照, B、F 为 P-gp 的表达率,

C、G 为 DNR 的摄取情况, D、H 为 Rh<sub>2</sub> 对 DNR 摄取的影响

A-D-K562 cells E-H-K562/VCR cells A and E, negative control; B and F, expression of P-gp;

C and G, intake of DNR; D and H, effects of Rh<sub>2</sub> on intake of DNR

图 1 K562 及 K562/VCR 细胞生物学特性的比较

Fig. 1 Comparison of biological characteristics on K562 and K562/VCR cells

#### 3.2 对 K562、K562/VCR 细胞生长的抑制作用:

人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 处理 48 h 后, K562 和 K562/VCR 细胞的生长受到明显抑制, 在低于 100  $\mu\text{g/mL}$  的质量浓度范围内, 抑制率随药物质量浓度增加呈升高趋势 (图 2、3)。药物作用 48 h 后, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562 细胞的  $IC_{50}$  为 44.5  $\mu\text{g/mL}$ , 对 K562/VCR 细胞的  $IC_{50}$  为 59.4  $\mu\text{g/mL}$ 。从倒置显微镜下观察细胞形态, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用后, 肿瘤细胞除了增殖受到抑制外, 也出现了大量的凋亡细胞, 表现为细胞胞浆浓缩、体积缩小、核碎裂呈小块、形成明显的凋亡小体, 且凋亡细胞的数量随着作用时间的延长而增加 (图 3)。

3.3 诱导 K562/VCR 细胞的凋亡: K562/VCR 细胞经人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 在 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 min 后, 该细胞的死亡明显增加。如表 1 所示, 根据流式细胞术结果, 将细胞分为 3 组: AnnexinV<sup>+</sup> 组为凋亡细胞

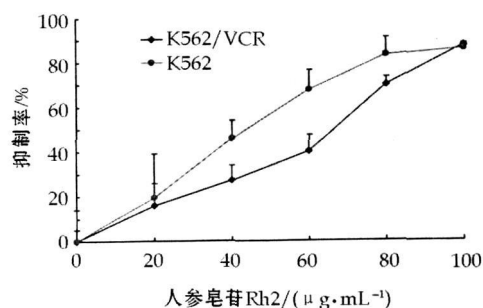
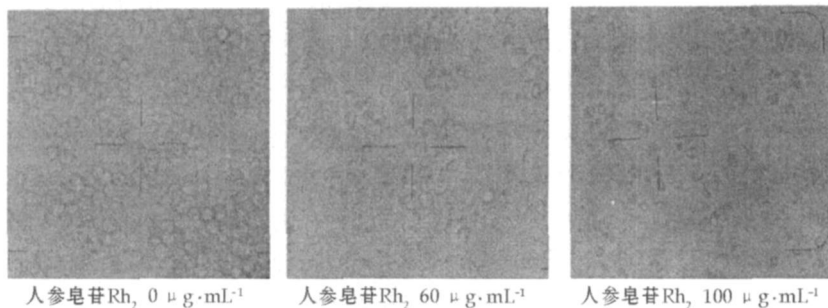


图 2 不同质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 处理 48 h 后 K562 和 K562/VCR 细胞生长的抑制曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 2 Inhibitory curves of Rh<sub>2</sub> on growth of K562 and K562/VCR cells treated by ginsenoside Rh<sub>2</sub> at different concentrations for 48 h ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

图 3 不同质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 处理 48 h 后 K562/VCR 细胞的形态Fig. 3 Morphology of K562/VCR cells treated by different concentrations of ginsenoside Rh<sub>2</sub> for 48 h表 1 K562/VCR 细胞经不同质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 处理 30 min 后的凋亡情况 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )Table 1 Apoptosis of K562/VCR cells treated by ginsenoside Rh<sub>2</sub> at different concentrations for 30 min ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

人参皂苷 Rh <sub>2</sub> / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Annexin V <sup>+</sup> / %	Annexin V <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> / %	Annexin V <sup>-</sup> PI <sup>-</sup> / %
0(对照)	3.2±3.5	13.7±4.0	76.7±3.8
50	6.2±1.3	15.0±3.9	70.6±13.0
100	14.9±5.0*	13.9±5.4	69.5±5.8
200	27.8±8.7***	14.5±1.7	60.3±8.6*
300	51.5±6.9***	13.7±5.2	45.6±13.5**

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group

(包括早期凋亡和晚期凋亡), Annexin V<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> 为坏死细胞, Annexin V<sup>-</sup> PI<sup>-</sup> 为活细胞。可以发现, 随着人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 质量浓度的增加, 凋亡细胞的比例明显增加, 活细胞的比例明显下降, 但坏死细胞的数量并无明显改变。通过 Probit 回归分析, 该条件下, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 杀伤 K562/VCR 细胞 (包括坏死和凋亡) 的 IC<sub>50</sub> 值为 273.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.4 对 K562/VCR 细胞耐药的逆转: 通过研究不同质量浓度人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562 及 K562/VCR 细胞摄取 DNR 的影响发现, K562 细胞的 DNR 摄取率无明显改变 (图 1-C、D), 但 K562/VCR 的 DNR 摄取率明显增加 (MFI: 280 vs 941) (图 1-G、H)。对人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 增强 K562/VCR 对 DNR 摄取进行量效关系研究显示, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 即可明显提高 K562/VCR 对 DNR 的摄取, 但 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上时, 随着质量浓度的进一步增加, DNR 的摄取率并无明显增加。而人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562/VCR 细胞表面 P-gp 的表达并无明显影响 (表 2)。

本实验还同时观察了人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 逆转 K562/VCR 细胞对 DNR 耐药的情况。0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 DNR 与 K562/VCR 共孵育 48 h 后, 对其无明显杀伤作用 (MTT 结果 A 值  $1.64 \pm 0.17$  vs  $1.42 \pm$

0.13,  $P > 0.05$ ), 但在培养体系中加入不同质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub>, K562/VCR 对 DNR 的敏感性明显增强, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可使 K562/VCR 对 DNR 的敏感性提高到原来的 6.30 倍 (表 3)。

表 2 K562/VCR 细胞经不同质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 处理后P-gp 表达量及摄取 DNR 能力的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )Table 2 K562/VCR Cells expression of P-gp and intake of DNR treated by ginsenoside Rh<sub>2</sub> at different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

人参皂苷 Rh <sub>2</sub> / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	P-gp		DNR	
	阳性率/%	MFI	阳性率/%	MFI
0(对照)	89.5±7.3	54.0±9.1	98.3±1.1	74.5±9.9
25	95.5±0.3	79.5±3.8	99.4±0.3	129.7±19.7**
50	95.8±1.4	82.1±14.3	99.4±0.6	194.2±34.8***
75	93.3±4.5	73.9±16.7	99.2±1.2	202.0±21.1***
100	93.2±4.0	69.5±10.6	99.5±0.7	213.3±4.1***

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group表 3 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562/VCR 细胞耐药的逆转 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )Table 3 Reverse effects of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on drug resistance of K562/VCR cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	A	抑制率/%	逆转倍数
对照	1.64±0.17	-	-
DNR	1.42±0.13	13±3	-
DNR+ 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	0.97±0.30	41±15	3.07
DNR+ 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	0.65±0.31	60±14	4.48
DNR+ 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	0.28±0.04	84±10	6.30

\* 经单因素方差分析及组间两两 LSD 检验, 仅对照组与 DNR 组比较无统计学差异, 其他各组两两比较均有显著差异 ( $P < 0.05$ )

\* As tested by one way ANOVA among all groups and LSD test between every two groups, every comparison shows significant difference ( $P < 0.05$ ) between each two groups except comparison of control group and DNR group

#### 4 讨论

人参是我国传统的名贵中药材, 人参皂苷是人参抗肿瘤作用的主要有效成分。目前发现, 人参皂苷的多种单体, 如 Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>2</sub>、Rh<sub>3</sub> 等都具有抗肿瘤作

用<sup>[9]</sup>。人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 是人参中提取的天然活性成分, 具有很高的抗肿瘤活性, 而对正常细胞无毒性, 它具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、诱导分化、抑制肿瘤 DNA 合成、提高荷瘤机体的免疫功能、抑制肿瘤转移和抗肿瘤耐药性增强等多重作用<sup>[3,4]</sup>。

本研究表明, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 K562 及 K562/VCR 的生长具有明显的抑制作用, 且在一定的质量浓度范围内表现出较好的量效关系。100 μg/mL 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用两种细胞 48 h 后, 其抑制率接近 90%。但它对两种细胞的抑制能力却并不相同, 对 K562 及 K562/VCR 的 IC<sub>50</sub> 分别为 44.5、59.4 μg/mL, 表明 K562/VCR 细胞株对人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 的耐受能力更强, 考虑可能 K562/VCR 的耐药机制对人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 也有一定的作用。

人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 具有较强的诱导 K562/VCR 细胞凋亡的能力, 较低质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 与 K562/VCR 共培养 48 h 可明显引起细胞生长的抑制和凋亡, 而即使在 37 °C 作用 30 min, 通过流式细胞术也可检测到凋亡细胞, 但其 IC<sub>50</sub> 明显高于长期培养实验。本研究同时显示, 随着人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 剂量的增加, 凋亡细胞的比例 (包括早期凋亡和晚期凋亡) 明显增加, 但坏死细胞的数量并无明显改变, 提示人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 主要通过细胞凋亡途径引起 K562/VCR 细胞的死亡。Ham 等<sup>[10]</sup> 通过对 HeLa 细胞、MCF10A-ras 细胞和 MCF7 细胞的研究证实人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 主要是通过 Ca<sup>2+</sup> 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等信号分子上调 cJNK, 引起线粒体膜去极化诱发细胞凋亡。Kim 等<sup>[11]</sup> 则发现人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 能激活 caspase 1、3 和上调 Bax, 从而诱发神经母细胞瘤细胞株的凋亡。

将 K562 细胞诱导成耐药的 K562/VCR 细胞后, 它对 DNR 的摄取明显降低, 其细胞表面的 P-gp 的数量显著增加, 提示 P-gp 可能是 K562/VCR 耐药的重要机制。若将耐药细胞同时与人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 作用, 则细胞对 DNR 的摄取明显提高, 也对 DNR 的杀伤作用更为敏感, 证实人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可以逆转 K562/VCR 的耐药, 且低质量浓度的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> (12.5~50 μg/mL) 就能达到明显的效果, 而剂量进一步增加后, 该效应提高不明显, 但人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 本身可以对 K562/VCR 细胞产生毒性作用。在

DNR 摄取率提高的同时, 流式细胞术检测 K562/VCR 细胞表面的 P-gp 的数量并没有下降。该结果与张晖等<sup>[12]</sup> 发现的人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 能够逆转人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/ADM 的耐药, 但并不影响其 P-gp 和 MDR-1 mRNA 表达的结果相似。人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 在不下调 P-gp 数量的状态下可以逆转 K562/VCR 细胞的耐药, 考虑可能是: ①人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对 P-gp 外排泵的功能影响更为明显。②抑制了非 P-gp 的耐药途径。具体机制还有待于进一步研究。

本研究提示, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对人白血病细胞 K562 及其耐药株 K562/VCR 具有多重作用, 不仅能抑制肿瘤细胞生长, 诱导细胞的凋亡, 还可以逆转耐药细胞的耐药, 是一种具有广阔开发前景的抗白血病药物。

#### 参考文献:

- [1] Jabr Milane L S, van Vlerken, Yadav S, *et al.* Multifunctional nanocarriers to overcome tumor drug resistance [J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(7): 592-602
- [2] 朱荣鑫, 张赛龙, 金永生. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(1): 5-10
- [3] 赵越, 苏适. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗肿瘤作用的研究 [J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(2): 61-63
- [4] 王占峰, 罗毅男, 洪新雨, 等. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 抗肿瘤作用机制的研究 [J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2005, 6(1): 50-52
- [5] 韩颖, 姜彬慧, 胡筱敏, 等. *Fusarium sacchari* 转化三七皂苷的稀有抗肿瘤成分 [J]. *中草药*, 2007, 38(16): 830-832
- [6] 侯毅鞠, 袁忠海, 田晶, 等. 人参皂苷单体 Rh<sub>2</sub> 诱导髓性白血病细胞株凋亡的时效与量效 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(12): 2331-2334
- [7] 袁忠海, 侯毅鞠, 扈昕虹, 等. 人参皂苷单体 Rh<sub>2</sub> 对人 K562 白血病细胞增殖和凋亡的时效和量效分析 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(47): 39-41
- [8] 石淑文, 郭淑芬. 多药耐药细胞系 K562/HHT 和 K562/VCR 的建立及耐药性逆转的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 1998(1): 15-18
- [9] 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
- [10] Ham Y M, Lim J H, Na H K, *et al.* Ginsenoside Rh<sub>2</sub> induced mitochondrial depolarization and apoptosis are associated with reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup>-mediated cJun NH<sub>2</sub> terminal kinase 1 activation in HeLa cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(3): 1276-1285
- [11] Kim Y S, Jin S H. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> induces apoptosis via activation of caspase 1 and -3 and up-regulation of Bax in human neuroblastoma [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(8): 834-839
- [12] 张晖, 王华庆, 张会来, 等. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 逆转 P-gp 介导的 MCF-7/ADM 多药耐药性的基础研究 [J]. *肿瘤*, 2007, 5: 365-369.