

MAPK 信号转导通路在人参多糖诱导白血病 K562 细胞凋亡中的作用

魏 强, 李 静, 刘 艺, 赵 亮, 夏 菁, 游智梅, 李丹阳, 陈地龙*

重庆医科大学 组织学与胚胎学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

摘 要: **目的** 探讨人参多糖诱导白血病 K562 细胞凋亡的机制。**方法** 将对数生长期 K562 细胞分成对照组和人参多糖组, 对照组细胞常规培养, 人参多糖组细胞培养体系中加入人参多糖 0.4 g/L。各组细胞培养 48 h 后, 流式细胞术和 Hoechst 33258 染色法检测 K562 细胞凋亡情况; RT-PCR 检测细胞 p38、JNK 基因表达; 采用免疫荧光实验检测细胞中 p-p38、p-JNK 蛋白表达, 测定 Caspase-3 的活性; Western blotting 检测细胞中 p38、JNK、p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 蛋白的变化。结果与对照组比较, 人参多糖组 K562 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$), 出现明显的细胞核固缩现象, K562 细胞 p38 mRNA 与 JNK mRNA 明显增多。免疫荧光检测显示, p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 表达明显增强且向胞核转移; Western blotting 检测显示, 人参多糖组 K562 细胞 p38、JNK 总蛋白无明显变化 ($P > 0.05$); p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 有增加的趋势 ($P < 0.05$)。**结论** 人参多糖能促进 K562 细胞凋亡, 其作用可能是通过影响 MAPK 信号传导通路实现的。

关键词: 人参多糖; 人红白血病 K562 细胞; 细胞凋亡; MAPK 信号传导通路; p38; JNK

中图分类号: R285.5; R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)02-0193-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.015

Effect of MAPK signal transduction pathway on apoptosis of leukemia K562 cells induced by ginseng polysaccharide

WEI Qiang, LI Jing, LIU Yi, ZHAO Liang, XIA Jing, YOU Zhi-mei, LI Dan-yang, CHEN Di-long

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

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms of the ginseng polysaccharide (GPS) on the apoptosis of leukemia K562 cells. **Methods** The K562 cells at logarithmic growth phase were divided into control and GPS groups. The cells in the control group were normally treated and cells in GPS group were incubated with 0.4 g/L GPS. Flow cytometry and Hoechst 33258 staining were used to demonstrate the apoptotic changes in the two groups after incubation for 48 h. Gene expression of p38 and JNK were detected by RT-PCR. The immunofluorescence staining was used to detect the activation of Caspase-3 and expression of p-p38 and p-JNK protein. The changes of p38, JNK, p-p38, p-JNK, and cleaved Caspase-3 protein were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate of K562 cells in GPS group was significantly increased ($P < 0.05$). After the treatment with GPS, chromatin condensation was observed when the cells were stained by Hoechst 33258. The expression of p38 mRNA and JNK mRNA was obviously increased. The immunofluorescence staining results showed that the expression of p-p38, p-JNK, and cleaved Caspase-3 proteins was significantly increased in GPS group and obviously transferred to the nucleus. The Western blotting results showed that there was no significant change in total p38 and JNK protein ($P < 0.05$), but an increasing trend in p-p38, p-JNK, and cleaved Caspase-3 was observed ($P < 0.05$). **Conclusion** GPS could induce K562 cell apoptosis and the effect may be achieved through MAPK signal transduction pathway.

Key words: ginseng polysaccharide; leukemia K562 cells; apoptosis; MAPK signal transduction pathway; p38; JNK

人参具有补气生血之功效, 是中医临床补气要药, 人参多糖 (GPS) 是其主要药用成分之一。前期研究表明, 人参多糖可以抑制人红白血病 K562 细胞的增殖, 诱导其向成熟方向分化与凋亡^[1]。笔

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81171929, 31271368); 重庆市教委基金项目 (KJ110308)

作者简介: 魏 强 (1985—), 男, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事中药调控血液肿瘤的相关信号通路研究。

Tel: 15922957148 E-mail: sanwhich@163.com

*通信作者 陈地龙 Tel: (023)68485614 E-mail: chendilong@21cn.com

者等应用 Illumina 全基因组表达谱基因芯片对人参多糖作用 K562 细胞前后的基因表达差异进行检测,发现人参多糖通过影响 T 细胞受体信号通路、糖酵解信号转导通路和代谢通路对 K562 细胞产生促凋亡和诱导分化的作用^[2],结合相关文献报道可知,在上述多条通路中均有 MAPK 信号转导通路及其下游通路的激活。本实验探讨人参多糖对 K562 细胞 MAPKs 通路中的主要促细胞凋亡分子 p38、JNK 分子的表达及其磷酸化活化分子 p-p38、p-JNK 水平变化的影响,旨在阐述人参多糖抑制白血病细胞增殖、促进细胞凋亡的机制,为开发靶向治疗白血病的天然抗肿瘤药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

人参多糖注射液(规格 3 mg/mL),山西普德药业有限公司,批号 20071201,用时以 RPMI 1640 培养液配制成所需质量浓度,滤过除菌。

RPMI 1640 培养基,美国 Gibco 公司;小牛血清,杭州四季青公司;6 孔培养板,美国 Falcon 公司;Annexin-V 双染法检测凋亡试剂盒,南京凯基生物公司;Hoechst 33258,碧云天生物技术研究所;兔抗人 p38、p-p38(相对分子质量 3.8×10^4)、JNK、p-JNK(相对分子质量分别为 4.6×10^4 、 5.4×10^4),Santa 公司;cleaved Caspase-3(相对分子质量 1.7×10^4),Anbo 公司;ECL 发光试剂盒,Millipore 公司。

1.2 人红白血病 K562 细胞株

本实验室保存,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 仪器

CO₂ 细胞培养箱,美国 Forma scientific 公司;倒置显微镜、激光共聚焦显微镜,日本 Olympus 公司;Bio-Rad M450 酶标测定仪、4800 型 PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 生产;FACScan 型流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

K562 细胞以 7×10^8 /L 接种于 RPMI 1640 培养液中,在 37 ℃、5%CO₂、饱和湿度下常规培养,每 2~3 天传代 1 次。

2.2 Annexin-V 双染法检测细胞凋亡

取对数生长期的 K562 细胞接种于 6 孔板中,调整密度为 1×10^5 /mL。实验分为 2 组:对照组细胞常规培养;人参多糖组细胞培养体系中加入人

多糖,终质量浓度为 0.4 g/L。细胞培养 48 h 后,收集各组所有悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /mL,取 1 mL 细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,去培养基,加 RNA 酶,37 ℃水浴 1 h,放入冰浴加入 0.5 mg/L 碘化丙啶(PI)及 Annexin V,流式细胞仪检测。采用 CELIQUEST 软件分析细胞凋亡率。

2.3 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡

分组及加药处理同“2.2”项。培养 24 h 后取样,PBS 清洗 1 次,加入 4%多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 清洗 2 次,加入 1 mmol/L Hoechst 33258 室温染色 15 min,封片,荧光显微镜(激发波长 365 nm)下观察($\times 200$)细胞核形态。

2.4 RT-PCR 检测 K562 细胞 p38、JNK mRNA 的表达

分组及加药处理同“2.2”项。每组设 3 个复孔。培养 48 h 后取样,Trizol 法提取 RNA,RT-PCR 检测细胞中 p38、JNK mRNA 的表达。PCR 引物序列:p38 正向引物:5'-ACCGTTTCAGTCCATCATTC-3',反向引物:5'-GTCAGCTTCTGGCACTTCAC-3',产物 198 bp;JNK 正向引物:5'-CAAGCAGTTA-GATGAAAGGGAA-3',反向引物:5'-CAGACGACGATGATGATGGA-3',产物 175 bp;GAPDH 正向引物:5'-ACAGCCTCAAGATCATCAGCA-3',反向引物:5'-TGAGTCCTTCCACGATACCAA-3',产物 99 bp。PCR 反应步骤:94 ℃、5 min 解链后,94 ℃、30 s,退火温度 58 ℃、30 s,72 ℃ 延长 20 s,循环 34 次,内参 28 次,72 ℃ 延长 10 min。

2.5 免疫荧光检测 K562 细胞 p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 蛋白的表达和定位

分组及加药处理同“2.2”项。48 h 后细胞经 PBS 洗涤、离心甩片,以兔抗人 p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 多克隆抗体进行免疫荧光检测。

2.6 Western blotting 检测 K562 细胞 p38、p-p38、JNK、p-JNK、cleaved Caspase-3 的表达

分组及加药处理同“2.2”项。分别在培养第 24、48、72 h 收集各组细胞 1×10^6 个,提取细胞总蛋白,Bio-Rad 法定量蛋白。取 40 μ g 待测蛋白,行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2~3 h,4 ℃下与抗 p38、JNK、p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 抗体孵育过夜,以 TBST 漂洗后加入二抗常温孵育 2 h,洗膜后用显色剂 ECL 试剂显色、曝光。图像分析软件定量分析特定条带的灰度。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件对所得数据进行统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对 K562 细胞凋亡的影响

Annexin-V 双染法检测显示, 与对照组比较, 人参多糖组 K562 细胞凋亡率明显增加 (表 1), 提示人参多糖对 K562 细胞增殖的抑制作用可能是通过诱导 K562 细胞凋亡实现的。

表 1 人参多糖对 K562 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of GPS on apoptosis of K562 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞凋亡率 / %	细胞死亡率 / %
对照	—	4.20 ± 0.33	2.54 ± 0.42
人参多糖	0.4	$36.47 \pm 0.66^*$	$4.77 \pm 0.45^*$

与对照组比较: $*P < 0.05$

$*P < 0.05$ vs control group

Hoechst 33258 荧光染色法检测显示, 对照组 K562 细胞发出微弱的蓝色荧光 (图 1-A 箭头所示), 细胞核无明显的形态学改变; 人参多糖组 K562 细胞核浓缩聚集、碎裂, 核边集 (图 1-B 箭头所示), 并发出较强的蓝色荧光。结果见图 1。

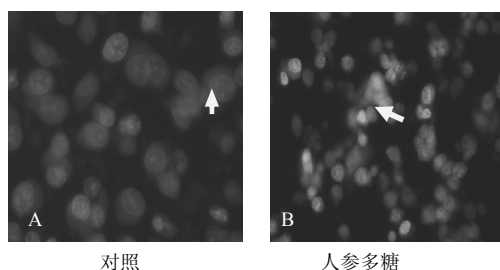


图 1 人参多糖对 K562 细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of GPS on apoptosis of K562 cells

3.2 对 K562 细胞 p38、JNK mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, 对照组 K562 细胞 p38、JNK mRNA 的表达水平明显低于人参多糖组。结果见图 2。

3.3 对 K562 细胞 p-p38、p-JNK、cleaved Caspase-3 蛋白表达和定位的影响

激光扫描共聚焦显微镜 ($\times 400$) 观察可见, 对对照组 p-p38 蛋白在胞核、胞浆中均有表达, 但在胞核中的表达较弱; 经人参多糖 0.4 g/L 作用细胞 48 h 后, p-p38 在胞浆、胞核中的表达量均明显增加, 尤其在胞核中的表达呈强阳性, 见图 3。对照

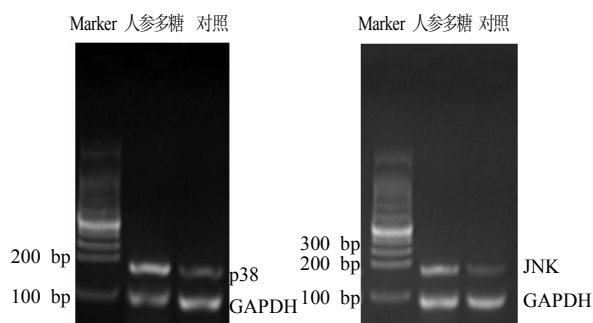


图 2 人参多糖对 K562 细胞 p38 和 JNK mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of GPS on expression of p38 and JNK mRNA in K562 cells

组 p-JNK 蛋白主要定位在胞浆, 人参多糖作用细胞 48 h 后, p-JNK 蛋白表达量明显增加, 且在胞核中也呈现较强的表达, 见图 3。对照组未见明显的呈黄色着染的 cleaved Caspase-3 阳性细胞核; 人参多糖组见较多的黄色着染的阳性细胞核, 见图 3。

3.4 对 K562 细胞 p38、JNK、p-p38、p-JNK 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Western blotting 检测显示, 与对照组相比, 经人参多糖 0.4 g/L 分别作用 K562 细胞 0、24、48、72 h 后, p38、JNK 蛋白无明显变化 ($P > 0.05$), p-p38、p-JNK 有增加的趋势, 且在作用 48 h 后增加明显 ($P < 0.05$); Caspase-3 逐渐被活化, 出现 1.7×10^4 的条带, 且其活化程度随着人参多糖作用时间延长而增强。结果见图 4。

4 讨论

目前对白血病的治疗大多仍采用传统的大剂量联合化疗, 但此疗法不良反应大, 尤其对机体免疫与造血系统有很大损害, 且复发率高。从祖国医学宝库中挖掘抑制白血病细胞恶性增殖的方法是研发高效低毒的抗白血病药物的有效途径之一。人参多糖可以促进正常血细胞生成, 明显增强免疫系统的功能, 并可增加淋巴细胞转化率, 还可提高放疗后被抑制的细胞介导的免疫功能, 在一定程度上减少肿瘤放疗的不良反应^[3-5]。

肿瘤细胞的增殖、分化和信号转导, 尤其与 MAPK 信号转导通路的关系密切, 且其中很多 MAPK 成员与血液系统肿瘤的关系密切^[6]。MAPK 级联具有高度保守性, 采用三级激酶级联传递信号: 细胞外刺激通过某些环节使 MAPK 激酶激酶 (MAPKKK) 激活, 转而激活 MAPK 激酶 (MAPKK), 然后再通过双位点磷酸化使 MAPK 活

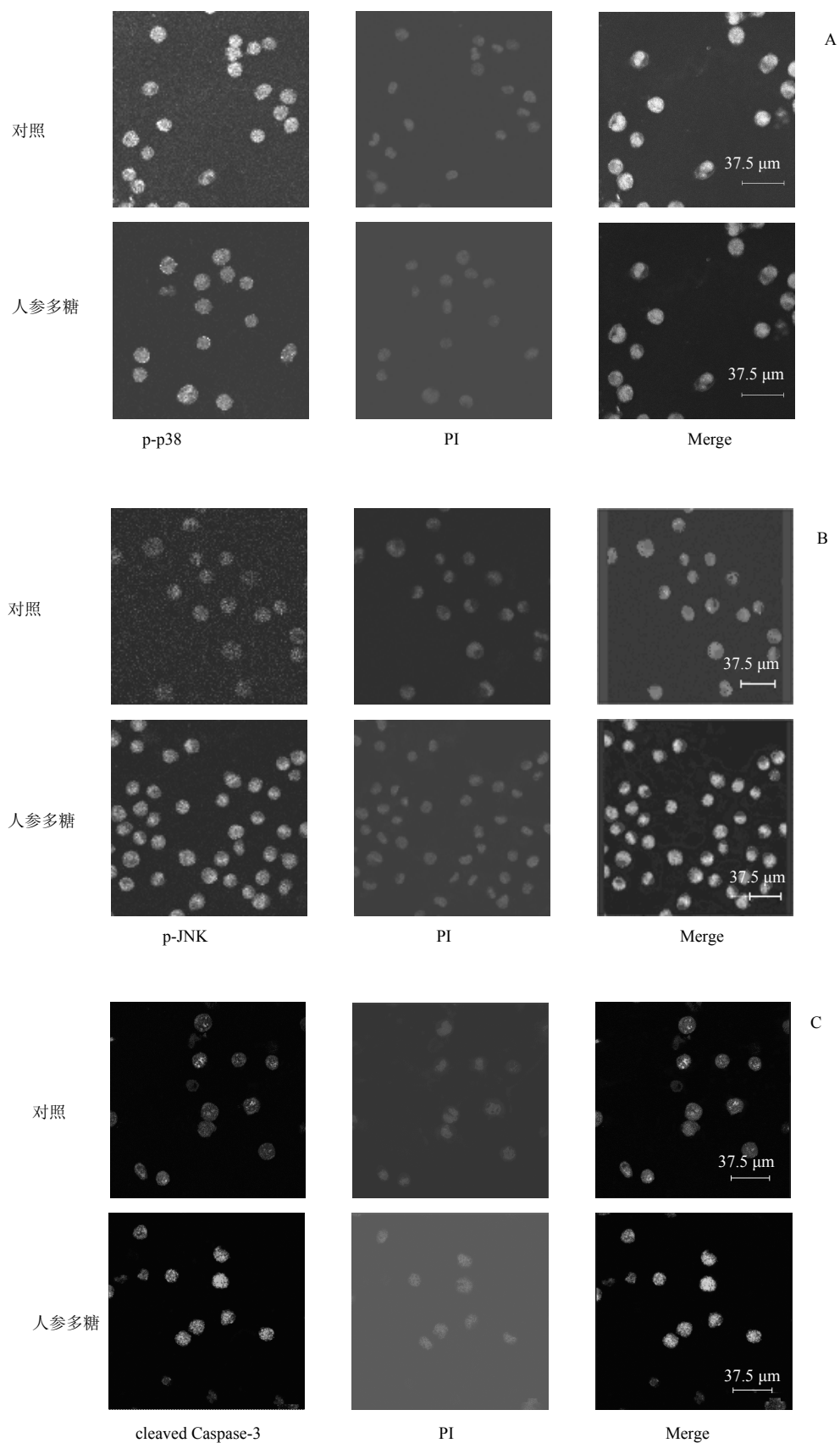


图 3 人参多糖对 K562 细胞 p-p38 (A)、p-JNK (B)、cleaved Caspase-3 (C) 蛋白表达和定位的影响

Fig. 3 Effects of GPS on expression and locations of p-p38 (A), JNK (B), and cleaved Caspase-3 (C) proteins in K562 cells

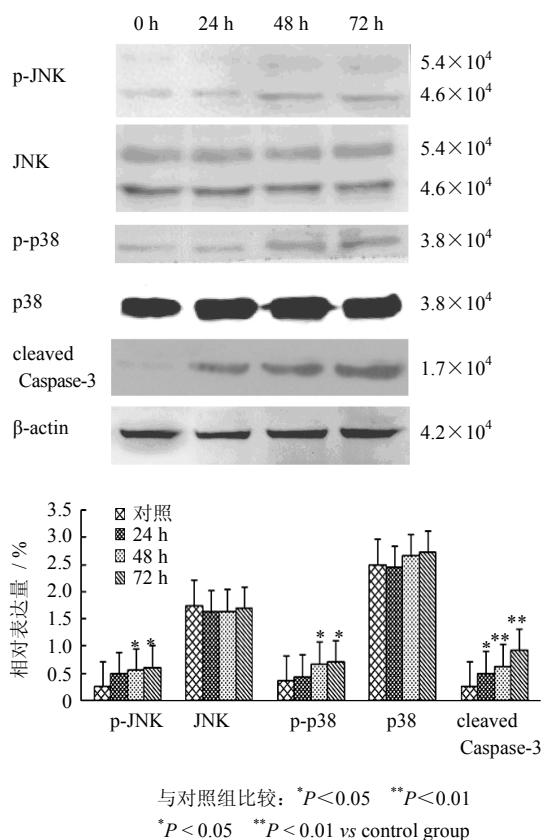


图4 人参多糖对 K562 细胞 p-JNK、JNK、p-p38、p38、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 4 Effects of GPS on expression of p-JNK, JNK, p-p38, p38, and cleaved Caspase-3 in K562 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

化后,磷酸化其下游底物如转录因子、蛋白激酶、酶、结构蛋白等,以此调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡等过程^[7-8]。JNK 与 p38MAPK 是介导细胞因子及应激刺激导致细胞凋亡、分化及炎症反应的重要细胞内信号转导途径^[9-10]。MAPK 作为调控细胞信号的主要途径之一,控制着细胞的增殖、分化、凋亡等过程,其某个环节发生问题可引起细胞生长失控,肿瘤发生。因此,以此信号途径为靶点,可以干预肿瘤进程,是肿瘤的治疗策略之一。

在静止的细胞中, JNK、p38 主要定位于细胞质,当其被刺激因素激活后,一部分活化的 JNK 和 p38 便转位到细胞核中,通过磷酸化而激活多种核内转录因子,从而促进相关靶基因的转录和新蛋白质的合成,发挥相应的生物学效应。

前期研究表明,人参多糖可抑制 K562 细胞增殖、诱导其向成熟方向分化和凋亡;基因芯片实验结果显示,人参多糖处理 K562 细胞后 MAPK 信号

通路中的上游通路 CD3 分子明显下调,很可能会引起 MAPK 信号通路的激活^[1]。本实验结果显示,与对照组相比,人参多糖作用 K562 细胞 48 h,细胞凋亡明显增加, JNK、p38 mRNA 表达逐渐增强。免疫荧光检测显示,对照组 JNK 蛋白的活化形式 p-JNK 蛋白表达较弱且主要定位在胞浆,而经人参多糖作用细胞 48 h 后, p-JNK 蛋白表达明显增加,且有大量 p-JNK 蛋白转移至胞核中;对照组 p38 蛋白的活化形式 p-p38 蛋白在胞核、胞浆均有表达,人参多糖组 p-p38 的表达明显增强,尤其在胞核中蛋白表达呈强阳性,表明有大量 p-p38 蛋白转移至胞核中。Western blotting 检测显示,人参多糖 0.4 g/L 作用 K562 细胞 0、24、48、72 h 后, JNK 和 p38 蛋白的表达变化不明显,但 p-JNK 和 p-p38 均有明显的递增趋势,这与免疫荧光结果相一致。

Caspases 通路是一切细胞凋亡信号传导的共同通路,而 Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者。未活化的 Caspase-3 以酶原的形式存在,被激活后可裂解产生 1.7×10^4 的活性片段,后者可进入核内激活核酸内切酶从而切割 DNA,导致细胞凋亡。JNK 进入细胞核激活相应转录因子后能诱导 FasL、TNF 等死亡配体的表达,从而启动死亡受体途径的细胞凋亡。而 p38 被激活后通过转位入核,启动 c-myc/s-myc, c-fos, c-jun 等原癌基因转录,进而构成凋亡信号网络,诱导凋亡执行蛋白 Caspase 的表达。本实验结果表明,人参多糖处理 K562 细胞后,胞核内 Caspase-3 有较强的表达,Western blotting 检测也证实人参多糖使 Caspase-3 活化,且活化程度随药物作用时间的延长而增强。

综上所述,人参多糖可能是通过 MAPK 信号通路来活化 Caspase-3,促进 K562 细胞凋亡。然而人参多糖是直接作用于 p38MAPK 和 JNK 信号分子还是通过调节其上游激酶和/或信号分子而间接发挥作用仍不清楚,尚需进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 何 轩, 姜 蓉, 李 静, 等. 人参多糖注射液体外诱导人白血病细胞株 K562 增殖抑制及分化 [J]. 中国组织工程与临床康复, 2010, 49(14): 9225-9229.
- [2] 李建平, 何 轩, 姜 蓉, 等. 人参多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 940-943.
- [3] Surh Y J, Na H K, Lee J Y, et al. Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. J Korean Med, 2001,

- 16(Suppl): 38-41.
- [4] Wang J, Zuo G, Li J, *et al.* Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46(4): 389-395.
- [5] Han S K, Song J Y, Yun Y S, *et al.* Ginsen improved Th1 immune response inhibited by gamma radiation [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(3): 343-350.
- [6] Platanias L C. Map kinase signaling pathway and hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4667-4678.
- [7] Cai J X, Tong T J. Advances in the research on p38 kinase [J]. *Prog Physiol Sci*, 1993, 24(2): 118-122.
- [8] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. *Physiol Res*, 2001, 81(2): 807-869.
- [9] Cho S D, Ahn N S, Jung J W, *et al.* Critical role of the c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways on sodium butyrate-induced apoptosis in DU145 human prostate cancer cells [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2006, 15(1): 57-63.
- [10] Obata T, Brown G E, Yaffe M B. MAPK kinase pathways activated by stress: the p38MAPK pathway [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(Suppl 4): N37-N77.

• 书讯 •

《傣医药研究》专著出版

传统医药是中华文明的重要组成部分，中医药和民族医药都是中华传统医药的瑰宝，也是民族文化的重要组成部分，在防病治病和养生保健方面为我国各族人民做出了重要贡献。中国是多民族国家，由于文化背景、地域性环境及宗教信仰等差异，传统医药呈现民族多元化的特点，内容丰富多样，并各自在不同领域崭露头角、独领风骚。傣族生活在中国的西南，是云南特有的少数民族，有着悠久的历史文化和丰富的医药理论体系，中国傣医药在2500年前已有记载，并于1983年被列入四大民族医药之列。

《傣医药研究》一书由高级工程师杨增明主编，其从事药物研究开发和药品生产质量管理20余年，专注于傣医药、民族医药研究10年，在多年工作成果和经验积累的基础上，以全新广阔的视觉对傣医药进行全面而系统的论述，内容丰富。

《傣医药研究》循着医药学的脉络，内容循序渐进，逐渐展开。从传统医药到中医药，到民族医药，再到傣医药；从傣族的历史及其聚居区的自然地理、人文地理，到傣族的民俗文化、宗教文化，再到傣医药；从基本概念到法律法规和政策，从傣药材到傣药成方制剂、医院制剂和经典名方，再从医疗、教学、文献资料、科技项目、发明专利、学术交流等多个不同的角度对傣医药的发展现状进行全面的梳理、总结和分析；最后著者对傣医药发展提出自己的思考。书中以表格、图片等形式提供了大量翔实的有关傣药材标准、傣成药标准、傣成药生产企业、傣医药相关医疗和研究及教学机构、傣医药古籍和当代专著、各级各类傣医药科技项目、傣医药发明专利等方面的数据。书中还较为详细地介绍了部分中药、民族药、傣药研发案例，以及经典傣药材、傣药成方制剂等，并穿插介绍了一些傣族药物故事。全书为读者清晰呈现当今傣医药的全貌，为从事傣医药医疗、教学、研究、开发、生产经营的科学工作者提供真实、科学、全面、系统的傣医药数据，是一本崭新的傣医药专著。

本书2012年11月由云南出版集团公司云南科技出版社出版。16开软装，定价56.00元。

联系电话：(0871)7275366 地址：云南昆明经济技术开发区经开路3号科技创新园A42 邮编：650217