

• 药理与临床 •

人参皂苷 Rh₂ 通过自噬途径对 KG1 α 细胞增殖和凋亡的影响刘小霞¹, 陈益², 熊伟², 李静², 陈地龙², 刘泽洪^{3*}

1. 江津中心医院 中医科, 重庆 402260

2. 重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

3. 重庆医药高等专科学校 生理学教研室, 重庆 401331

摘要: 目的 研究人参皂苷 Rh₂ (Rh₂) 对人白血病细胞 KG1 α 增殖的抑制作用, 并从自噬凋亡角度来探讨其机制。方法 采用 CCK-8 法检测 Rh₂ 对 KG1 α 细胞增殖的抑制作用; 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡; Hoechst 染色观察细胞核染色质的形态; 吖啶橙染色观察 Rh₂ 对细胞自噬的影响; Western blotting 和 RT-PCR 检测 Rh₂ 对白血病细胞自噬重要蛋白和基因表达的影响; 运用自噬抑制剂 (3-MA) 研究自噬对细胞增殖和凋亡的影响。结果 CCK-8 显示 Rh₂ 在低浓度时能有效抑制 KG1 α 细胞增殖, 且其抑制作用具有浓度和时间依赖性; FCM 检测和 Hoechst 染色结果显示 Rh₂ 能增加细胞的凋亡, 使染色质呈凋亡形态改变; 吖啶橙染色发现 Rh₂ 组细胞绿色荧光增强, 细胞出现大量的酸性自噬小泡; Western blotting 和 RT-PCR 结果发现 Rh₂ 上调 Beclin-1、LC3A、LC3B、激活型 Caspase-3 表达和增加 Bax/Bcl-2 值, 并激活 MAPK、ATK、ERK 信号通路; 细胞自噬剂 (3-MA) 会削弱 Rh₂ 对 KG1 α 细胞的增殖抑制和促凋亡作用。结论 Rh₂ 可能通过激活 MAPK、ATK、ERK 信号通路, 诱导细胞自噬途径, 从而抑制 KG1 α 细胞增殖和促进其凋亡。

关键词: 人参皂苷 Rh₂; 白血病; 自噬; 凋亡; MAPK; ATK; ERK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)02-0305-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.015

Effect of ginsenoside Rh₂ on proliferation and apoptosis of KG1 α cells by autophagy pathway

LIU Xiao-xia¹, CHEN Yi², XIONG Wei², LI Jing², CHEN Di-long², LIU Ze-hong³

1. Traditional Chinese Medicine Department, Jiangjin Central Hospital of Chongqing, Chongqing 402260, China

2. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

3. Department of Physiology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China

Abstract: Objective To investigate the antitumour activity of ginsenoside Rh₂ against human leukemia KG1 α cells through apoptosis and autophagy pathway. **Methods** CCK-8 assay was used to screen the most effective ingredient on the proliferations among ginsenoside Rh₂ in leukemia KG1 α cell line; FCM detected cell apoptosis; Hoechst staining observed the cell morphological changes of apoptosis; Acridine staining detected Rh₂ effected on autophagy; Western blotting and RT-PCR detected the expression levels of the proteins closely associated with autophagy and apoptosis. After joining autophagy inhibitors, using CCK-8 to test the proliferation activity of cells, cell apoptosis was measured by FCM. **Results** CCK-8 indicated that Rh₂ could inhibit the proliferation of KG1 α cells significantly with dose- and time-dependent manners; FCM indicated that Rh₂ induced apoptosis; Hoechst staining showed that KG1 α cells had typical apoptotic morphological changes by treated Rh₂; Acridine staining revealed that Rh₂ cause increase in the number of acidic autophagy vesicles in cells, causing cell autophagy levels increased; Western blotting and RT-PCR results showed that Rh₂ increased the expression of Beclin-1, LC3A, and LC3B, activated Caspase-3 and Bax/Bcl-2 rates, and MAPK, ATK, and ERK signaling pathway; After using autophagy inhibitors (3-MA), autophagy crippled that Rh₂ inhibited the proliferation and induced apoptosis in KG1 α cells. **Conclusion** Ginsenoside Rh₂ could significantly enhance autophagy through activated MAPK, ATK, and ERK signaling pathway, and then inhibit the proliferation and induce apoptosis in KG1 α cells.

Key words: ginsenoside Rh₂; leukemia; autophagy; apoptosis; MAPK; ATK; ERK

收稿日期: 2016-07-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271368)

作者简介: 刘小霞 (1988—), 女, 从事中药药理研究。Tel: 13436164018 E-mail: liuliuliu20160520@163.com

*通信作者 刘泽洪 (1988—), 男, 硕士研究生, 从事中药药理研究。Tel: 15320461190 E-mail: jichulihong8811@163.com

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 作为中国传统医学中的“补气”良药已运用千年之久^[1]。人参皂苷 Rh₂ (Rh₂) 是人参天然活性成分之一, 是 1 种从红参中分离得到的原人参二醇型单糖链皂苷单体化合物, 其毒性低、相对分子质量小、脂溶性好, 具有很强的抗肿瘤活性^[2]。近年来对其在抗肿瘤作用方面的研究表明, Rh₂ 的抗肿瘤作用较为广泛, 既可阻滞细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤的生长、诱导肿瘤细胞分化使其逆转、抑制肿瘤的转移, 又可通过影响和调节机体免疫功能, 增强机体对疾病的抵抗能力, 从而抑制肿瘤生长, 还可增强抗癌药的药效^[3]。

在真核生物中, 自噬是一种高度保守的生物学过程, 能维持细胞的代谢平衡^[4-5]。目前认为, 细胞死亡包括 3 种类型, 即坏死、凋亡和自噬性细胞死亡。细胞程序性死亡中, 自噬可能比凋亡扮演更为主动和重要的角色^[6]。自噬对肿瘤细胞起到双刃剑作用, 可以保护肿瘤细胞, 也可以杀伤肿瘤细胞^[7]。因此, 本研究 Rh₂ 对人白血病细胞 KG1 α 增殖的影响, 并从自噬凋亡角度来探讨其作用机制, 为 Rh₂ 应用于临床治疗白血病奠定实验和理论基础。

1 材料

1.1 细胞株

人白血病 KG1 α 细胞株购自上海 ATCC 细胞库。每次取对数生长期的 KG1 α 细胞以 $5 \times 10^8/L$ 接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 每 2~3 d 传代或换液。

1.2 药品

Rh₂ 购自成都曼斯特科技有限公司 (批号 78214-33-2, 质量分数 98%), 取 200 μ L DMSO 加入 20 mg Rh₂ 使之充分溶解, 配制成 100 mg/L 原液, -20 °C 冷冻保存。实验前用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液稀释成所需浓度。

1.3 试剂

胎牛血清、RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学研究所); Annexin V-PI 双标凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物公司); TAKARA 反转录酶试剂盒、SYBR II 试剂 (Takara 公司); 吖啶橙、MDC 染液、3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 自噬抑制剂 (美国 Sigma 公司); MAPK 通路抗体试剂盒、Beclin-1、LC3A/B 多克隆抗体、Bcl-2、Bax 多克隆抗体 (美国 Epitomics 公司)。Caspase-3、Atg3、Atg5、Atg7、Atg12 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.4 仪器

超净工作台 (Sanyo 公司); 倒置显微镜、倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); 低温离心机 (Sigma 公司); 酶标仪、垂直电泳仪、电转仪、ChemiDocXRS 化学发光成像系统、PCR 仪 (Bio-Rad 公司); 二氧化碳培养箱 (Thermo 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法测定细胞增殖

培养对数生长期的 KG1 α 细胞, 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 每孔加入的细胞液体积 10 μ L。分为空白对照组、Rh₂ 药物组和本底对照组, 每组设 6 个复孔, 每孔加入 200 μ L 药物, 空白对照组加入细胞及等量培养液, Rh₂ 药物组加入相应浓度 (20、40、60、80、100 μ mol/L) 的 Rh₂; 本底对照组只加 RPMI 1640 培养液。各组培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 检测液, 轻轻摇匀, 孵育 2.5 h 后, 用酶标仪 (波长 450 nm) 检测每孔吸光度 (*A*) 值, 并计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{本底对照}}) / (A_{\text{药物组}} - A_{\text{本底对照}})$$

2.2 流式细胞仪检测细胞早期凋亡

培养对数生长期的 KG1 α 细胞, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^8/L$, 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 200 μ L。实验分为空白对照组、Rh₂ (60 μ mol/L) 组。每孔 3 mL 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养 24 h 后, 分别收集各组细胞, 用预冷 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 洗涤 2 次, 4 °C、1 200 \times g, 离心 5 min。加入 RNA 酶、碘化丙啶 (PI) 和膜联蛋白 V (Annexin V), 置于冰上染色处理 30 min, 每组细胞 2×10^4 个, 上流式细胞仪检测, 重复实验 3 次。

2.3 Hoechst 染色

取对数生长期的 KG1 α 细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^8/L$, 接种于 6 孔培养板, 每孔加入 200 μ L。实验分为空白对照组 (含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液)、药物组 (加入 60 μ mol/L 的 Rh₂ 6 mL), 培养 48 h 后, 收集空白对照组和药物组细胞, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加甲醇-乙醇 (3:1) 固定液室温固定 15 min; 离心去除固定液加 Hoechst 染色液避光、室温染色 30 min, PBS 洗涤 1 次, 调整细胞浓度, 滴片, 荧光显微镜下观察。

2.4 吖啶橙染色

KG1 α 细胞用 Rh₂ (60 μ mol/L, 3 mL) 处理 24 h 后, 收集细胞, 选新配制的吖啶橙 (2 μ mol/mL), 37 °C 避光孵育 15 min, 在 EP 管中, 用 PBS 漂洗 3

次后, 调整细胞浓度, 取 1 滴细胞悬液滴到玻片上, 待细胞沉积到玻片上时, 吸去上层液体, 封片置于荧光显微镜下观察酸性的自噬小泡。50%甘油封片, 置于倒置荧光显微镜下观察、采图, 实验重复 3 次。

2.5 Western blotting 法检测凋亡及自噬相关蛋白表达

取对数生长期的 KG1 α 细胞, 调整细胞浓度到 $5 \times 10^8/L$, 接种到细胞培养瓶中。实验分组为对照组和药物组(分别加入 Rh₂ 10、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$), 置培养箱中常规培养。提取蛋白并将各组蛋白质量浓度调成 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 使蛋白完全变性后, 冷却, 每个样品取 10 μL 加入泳道中, 保证每孔中有 40 μg 待测蛋白样品, SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 分别加入 MAPK 信号通路抗体 (1:500)、Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000)、Caspase-3(激活型, 1:1000)、LC3A (1:1000)和 LC3B(1:1000)、Beclin-1(1:2000)、 β -actin (1:2000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 置于脱色摇床上, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。分别加入以 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗, 再用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 最后在保鲜膜上滴入 ECL 化学发光液, 在暗室进行 X 胶片曝光, 洗片。胶片晾干后扫

描胶片, 用 Quantity One 软件定量分析。重复 3 次。

2.6 RT-PCR 法检测自噬重要基因表达

参照试剂盒说明书进行, Trizol 提取细胞总 RNA。采用 TAKARA 反转录酶试剂盒逆转录 cDNA。应用 TAKARA 的 SYBR II 试剂检测自噬重要基因的 mRNA 水平, PCR 反应体系为 10 μL 。引物由上海生工生物公司提供, 引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参基因, 用目的基因与 GAPDH 的起始拷贝数比值表示目的基因的相对表达量, 实验重复 3 次。

2.7 3-MA 和 Rh₂ 联用对细胞增殖和凋亡的影响

实验分为 4 组, 空白对照组、Rh₂ (60 $\mu\text{mol/L}$) 组、3-MA (5 mmol/L) 组及 Rh₂ (60 $\mu\text{mol/L}$) + 3-MA (5 mmol/L) 组, 分别以 CCK-8 法、流式细胞仪、Western blotting 法检测细胞增殖、凋亡及蛋白表达。

2.8 统计学方法

所有数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较用双因素和单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 法。

3 结果

3.1 Rh₂ 对 KG1 α 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 检测结果 (图 1) 显示, 药物组与空白

表 1 实时荧光定量 PCR 相关基因引物序列

Table 1 Related gene sequence primers of RT-PCR reaction

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
LC3-A	CCTTCTTCCTGCTGGTGAA	GTTTCCTGGGAGGCGTAGAC
LC3-B	CCGGCTGTGTAGTCAGGGTA	CCGGCTGTGTAGTCAGGGTA
Beclin-1	CAACTGAGACCGTGGAGAGG	AGCCCTGTGCGAGACTGTAG
Atg3	CACCTAGTCCACCACTGTCCA	CGCCATCACCATCATCTTCT
Atg5	GCCATCAATCGAAACTCAT	AGCCACAGGACGAAACAGC
Atg7	TTCCAAGGTCAAAGGACGAA	ACTCCATCTGTGGGCTGCTA
Atg12	GTAGAGCGAACACGAACCATC	GGAAGGAGCAAAGGACTGA
GAPDH	CATCAAGAAGGTGGTGAAGA	CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG

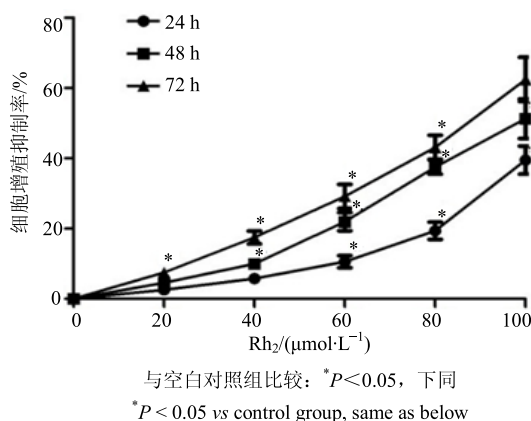


图 1 Rh₂ 对 KG1 α 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Inhibitory effect of Rh₂ on KG1 α cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

对照组比较, Rh₂ 能有效抑制白血病 KG1 α 细胞增殖, 并呈浓度和时间依赖性。且 Rh₂ 作用 KG1 α 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为 60 $\mu\text{mol/L}$ 。因此, 选择 Rh₂ 60 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验最高浓度。

3.2 Rh₂ 对 KG1 α 细胞凋亡的影响

Rh₂ (60 $\mu\text{mol/L}$) 处理 KG1 α 细胞 24 h 后, 流式细胞仪检测结果显示加药组早期和晚期凋亡细胞数量明显增多, 其早期凋亡率为 (12.00 \pm 2.60) %, 与空白对照组 [(3.18 \pm 0.52) %] 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 晚期凋亡率为 (16.32 \pm 3.45) %, 与空白对照组 [(3.19 \pm 0.73) %] 相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

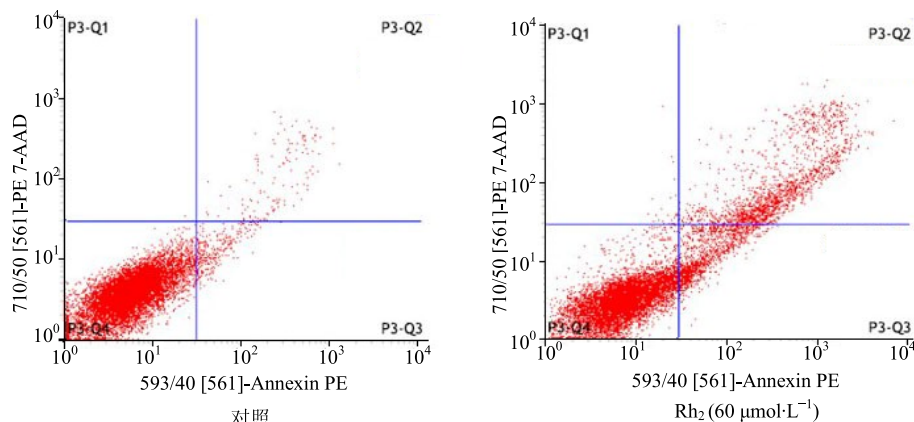


图 2 Rh₂ 对 KG1α 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of Rh₂ on cell apoptosis of KG1α cells

3.3 Rh₂ 对 KG1α 细胞核形态的影响

Rh₂ (60 μmol/L) 诱导 KG1α 细胞 48 h 后, 用 Hoechst 染色显示, 细胞核出现染色质浓缩、核碎裂、核边集的细胞凋亡现象, 并且细胞发出的蓝色荧光较空白对照组细胞强, 说明 Rh₂ 能诱导 KG1α 细胞凋亡 (图 3)。

3.4 吖啶橙染色观察细胞自噬

Rh₂ (60 μmol/L) 处理 KG1α 细胞 24 h 后, 用吖啶橙染色, 观察细胞内的自噬体 (图 4), 细胞内绿色代表酸性自噬小泡, 红色代表核仁, 经 Rh₂ 诱导后 KG1α 细胞中的酸性自噬小泡均明显增加, 对照组绿色的自噬小泡基本看不见。

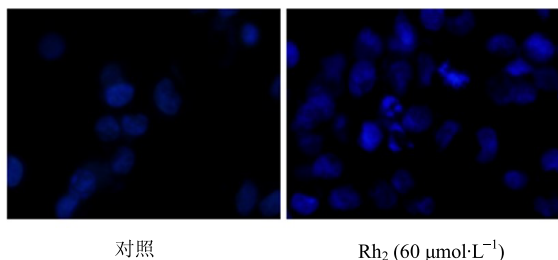


图 3 Hoechst 染色检测细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of KG1α cells detected by Hoechst staining

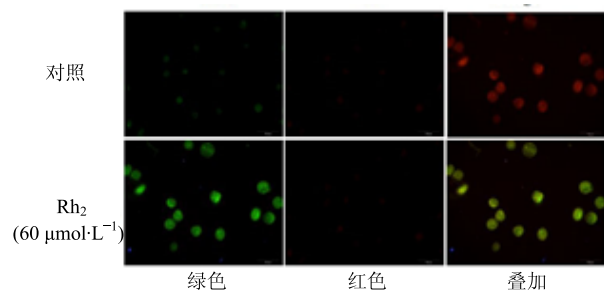


图 4 吖啶橙染色检测细胞自噬

Fig. 4 Cell autophagy detected by acridine orange staining

3.5 Rh₂ 对 KG1α 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, KG1α 细胞经不同浓度的 Rh₂ (20、40、60 μmol/L) 作用 48 h 后, 与对照组比较, 药物组中 Bcl-2 蛋白随 Rh₂ 浓度升高表达水平反而降低; Bax、Caspase-3 (激活型) 蛋白随 Rh₂ 浓度升高表达水平明显升高 (图 5)。

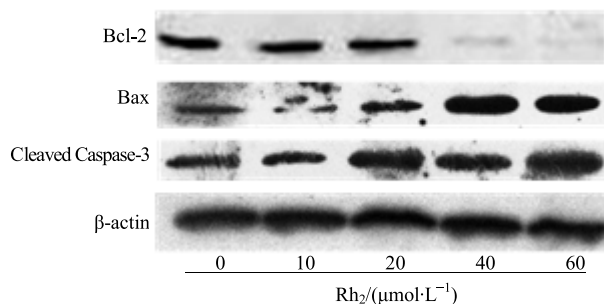


图 5 Rh₂ 对 KG1α 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Rh₂ on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 in KG1α cells

3.6 Rh₂ 调控 MAPK、AKT、ERK 信号通路

10、20、40、60 μmol/L Rh₂ 作用于 KG1α 细胞 24 h 后, Western blotting 结果显示, p38、JNK 和 ERK 蛋白的表达几乎没变化, p-p38 和 p-JNK 的表达增加, p-ERK 的表达下降, 提示 Rh₂ 能影响 MAPK、AKT、ERK 信号通路, 见图 6。

3.7 Rh₂ 对 KG1α 细胞自噬重要基因表达的影响

RT-PCR 检测结果如图 7 所示, 与对照组比较, KG1α 细胞经 60 μmol/L 的 Rh₂ 作用 24 h 后, 自噬相关基因 (Atg3、Atg5、Atg7、Atg12) 在 2 组细胞中变化不明显, 而自噬重要调控基因 Beclin-1、LC3A、LC3B 的表达却明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

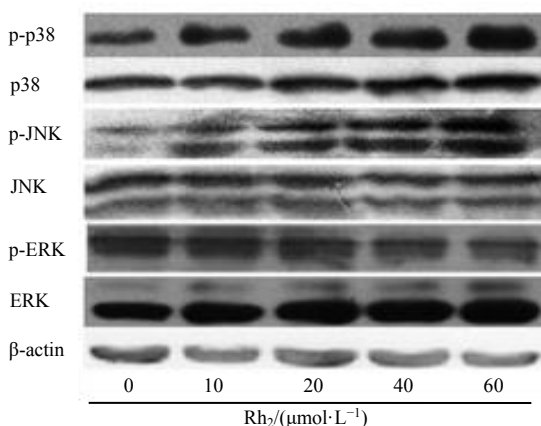


图 6 Rh₂ 影响 KG1 α 细胞中 MAPK 信号通路

Fig. 6 Effect of MAPK signaling way in KG1 α cells induced by Rh₂

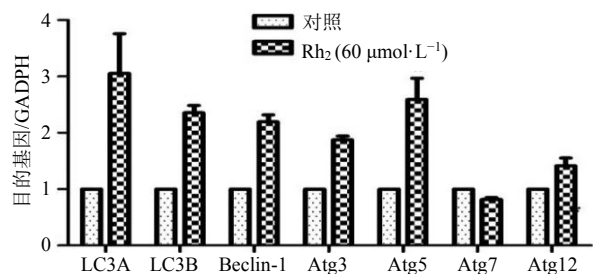


图 7 Rh₂ 对自噬重要基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Expression of autophagy important gene ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 Rh₂ 对 KG1 α 细胞自噬重要蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示,与对照组比较,KG1 α 细胞经不同浓度的 Rh₂ 作用后,Beclin-1、LC3A、LC3B 蛋白的表达水平明显增高(图 8)。实验结果说明,Rh₂ 能在分子水平上增加自噬重要的蛋白和基因的表达,进一步确定了 Rh₂ 能诱导白血病 KG1 α 细胞发生自噬。

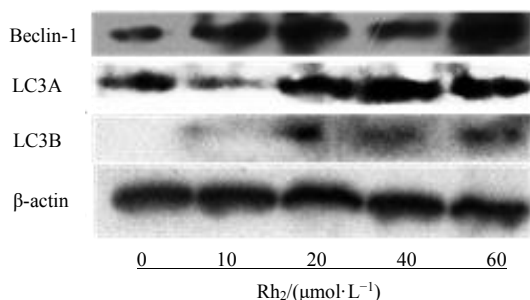


图 8 Rh₂ 对 KG1 α 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of Rh₂ on expression of protein related to autophagy in KG1 α cells

3.9 3-MA 和 Rh₂ 联用对细胞增殖和凋亡的影响

3.9.1 3-MA 和 Rh₂ 联用对细胞增殖的影响 CCK-8 检测细胞的增殖能力,发现单独用自噬抑制剂 3-MA 能轻微降低细胞活力,但是无统计学意义 ($P > 0.05$);单独使用 Rh₂ 能明显降低细胞活力,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);然而在联合加入 3-MA 和 Rh₂ 后,与单独加入 Rh₂ 组比较,细胞活力有明显的回升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明细胞自噬能增强 Rh₂ 对白血病 KG1 α 的增殖抑制(图 9)。

3.9.2 3-MA 和 Rh₂ 联用对细胞凋亡的影响 用流式细胞术检测细胞凋亡发现,细胞加入自噬抑制剂 3-MA 时,与对照组比较无明显改变(图 10);单独使用 Rh₂ 时,细胞凋亡明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);然而在联合加入 3-MA 和 Rh₂ 后,与单独加入 Rh₂ 组比较,细胞凋亡有明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明细胞自噬能增强 Rh₂ 对白血病 KG1 α 细胞的促凋亡作用。

3.9.3 3-MA 和 Rh₂ 联用对细胞凋亡作用相关蛋白的影响 Western blotting 结果如图 11 所示,单独运用

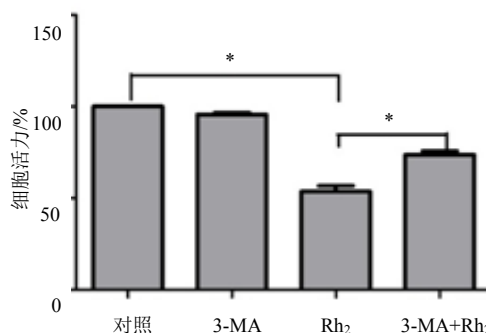


图 9 Rh₂ 通过自噬抑制细胞增殖作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Inhibition of Rh₂ on cell proliferation by autophagy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

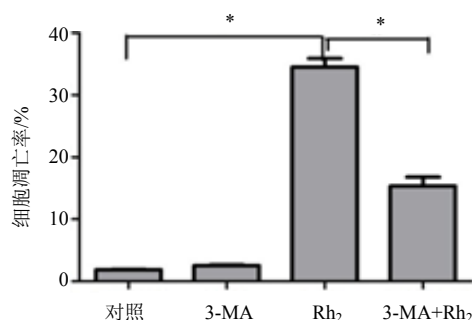


图 10 Rh₂ 通过自噬诱导细胞凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Induction of apoptosis by Rh₂ through autophagy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

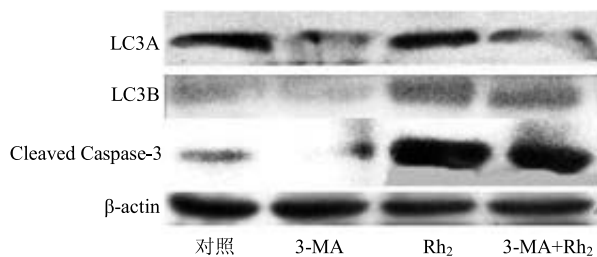


图 11 Western blotting 检测 Rh₂ 通过自噬诱导凋亡

Fig. 11 Induction of apoptosis by Rh₂ through autophagy detected by Western blotting

自噬抑制剂 3-MA 后, 细胞自噬关键蛋白 LC3A/B 表达有下降的趋势, 单独运用 Rh₂ 后, 细胞自噬关键蛋白 LC3A/B 和激活型的 Caspase-3 表达明显上升, 当同时加入自噬抑制剂 3-MA 和 Rh₂ 后, 细胞的自噬关键蛋白 LC3A/B 和激活型 Caspase-3 的表达比单独运用 Rh₂ 时明显下降, 说明抑制自噬后细胞凋亡现象减少, 自噬可促进人参皂苷 Rh₂ 诱导 KG1 α 的凋亡作用。

4 讨论

自然界中有丰富的抗肿瘤天然药物, 本课题组前期实验表明人参提取物中人参总皂苷和单体能在体外抑制白血病和肝癌细胞增殖、阻滞周期、促进凋亡。国内外研究证实, 人参皂苷单体能抑制各种肿瘤细胞的增殖, 促进肿瘤细胞发生凋亡^[8-9]。Rh₂ 含有单糖, 研究发现, 化学结构中含有的糖结构越少时, 抗肿瘤的活性越强^[10]。因此本实验采用 CCK-8 法研究 Rh₂ 对白血病细胞 KG1 α 增殖抑制作用, 发现 Rh₂ 能有效抑制白血病细胞的生长。通过 FCM 检测和 Hoechst 染色发现 Rh₂ 能促进细胞发生凋亡。Western blotting 检测发现 Rh₂ 能够增加 Bax/Bcl-2 的比例, 同时激活 Caspase-3, 说明了 Rh₂ 能通过线粒体途径诱导细胞发生凋亡。

细胞自噬和凋亡密切相关, 凋亡的早期, 细胞出现应激反应, 会出现自噬。为了探讨 Rh₂ 对白血病细胞自噬的影响, 运用吖啶橙和 Hoechst 染色, 发现加药组早期细胞出现酸性的自噬小泡。PCR 和 Western blotting 结果显示自噬相关基因和蛋白分子 (Beclin-1、LC3A 和 LC3B) 的表达均升高, 证明了 Rh₂ 能诱导白血病细胞发生自噬。

自噬异常与肿瘤的发生发展关系密切, 可以从不同生物学行为影响肿瘤的进程, 其中有细胞周期、增殖、凋亡、耐药、血管生成及肿瘤的治疗等方面

的调控^[11]。自噬和细胞凋亡的关系存在两面性, 维持细胞生存和促进细胞死亡^[12]。本课题组前期实验证明了 Rh₂ 既能诱导白血病 KG1 α 细胞凋亡又能诱导其发生自噬, 那么细胞自噬和凋亡关系是怎样的呢? 实验表明, 当同时加入自噬抑制剂 3-MA 和 Rh₂ 时, 与单独加入 Rh₂ 相比, KG1 α 的细胞凋亡减少和细胞活力增强。说明抑制细胞自噬, 可削弱 Rh₂ 对白血病细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用, 提示 Rh₂ 可以通过诱导白血病细胞发生自噬而促进细胞凋亡。

目前, MAPK、AKT 和 ERK 信号通路能调控自噬和细胞凋亡^[13-14]。前期研究证实 Rh₂ 诱导细胞自噬, 3-MA 通过抑制 Class III PI3K 的活性抑制自噬, 抑制细胞自噬可以削弱 Rh₂ 对 KG1 α 的抑制增殖和促凋亡作用。为了研究 Rh₂ 诱导细胞自噬凋亡的可能机制, 本实验运用 Western blotting 检测 MAPK、AKT 和 ERK 信号通路的关键蛋白, 发现 Rh₂ 能够激活 p38、JNK、ERK, 使其磷酸化, 证明了 Rh₂ 诱导细胞自噬凋亡可能是通过激活 MAPK、AKT 和 ERK 信号通路实现。

参考文献

- [1] 徐哲, 赵余庆, 贾力. 人参的词源学、生药学、产品及市场的现代评价 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 96-101.
- [2] Singh P, Singh H, Ahn S, *et al.* Pharmacological importance, characterization and applications of gold and silver nanoparticles synthesized by *Panax ginseng* fresh leaves [J]. *Artif Cell Blood Sub*, 2016, 11(18): 1-10.
- [3] 高瑞兰, 金锦梅, 牛泱平, 等. 人参总皂甙增加白血病细胞对化疗药物的敏感性 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(1): 17-19.
- [4] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. *Science*, 2004, 306(5698): 990-995.
- [5] Klionsky D J. Autophagy [J]. *Current Biol*, 2005, 15(8): 282-293.
- [6] Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis [J]. *Cell*, 2008, 135(7): 1161-1173.
- [7] Meredith A M, Dass C R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 35(10): 111-115.
- [8] Xia T, Wang J C, Xu W, *et al.* 20S-Ginsenoside Rh₂ induces apoptosis in human Leukaemia Reh cells through mitochondrial signaling pathways [J]. *Biol Pharm Bull*,

- 2014, 37(2): 248-254.
- [9] Xu H, Zhao X, Liu X, *et al.* Antitumor effects of traditional Chinese medicine targeting the cellular apoptotic pathway [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2015, 9(2): 735-744.
- [10] Wang W, Wang H, Rayburn E R, *et al.* 20 (S)-25-methoxyl-dammarane-3beta, 12beta, 20-triol, a novel natural product for prostate cancer therapy: activity *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of action [J]. *Brit J cancer*, 2008, 98(4): 792-802.
- [11] Ma Q, Chang Z, Wang W, *et al.* Rapamycin-mediated mTOR inhibition reverses drug resistance to adriamycin in colon cancer cells [J]. *Hepato-Gastroenterol*, 2015, 62(140): 880-886.
- [12] El-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, *et al.* Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer [J]. *J Cell Death*, 2013, 18(6): 637-655.
- [13] Lisiak N, Toton E, Rubis B, *et al.* The synthetic oleanane triterpenoid HIMOXOL induces autophagy in breast cancer cells via ERK1/2 MAPK pathway and Beclin-1 up-regulation [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16(8): 1066-1076.
- [14] Hsieh M J, Chend M K, Chen C J, *et al.* Glabridin induces apoptosis and autophagy through JNK1/2 pathway in human hepatoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(4): 359-366.