

# 人参总皂苷对白血病细胞 K562 凋亡及生存素表达的影响

吴东红 杨志刚 李庆华

**【摘要】 目的** 探讨人参总皂苷(TSPG)对人白血病细胞株 K562 生长和凋亡的影响及其可能机制。**方法** 采用噻唑兰比色法(MTT)观察 TSPG 对 K562 细胞生长的影响;流式细胞仪观察 TSPG 对细胞凋亡的影响;用 RT-PCR 检测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡中生存素(Survivin)基因的表达情况。**结果** TSPG 对 K562 细胞生长有抑制作用,呈剂量依赖关系( $P < 0.05$ );10、100、200  $\mu\text{g/ml}$  组细胞凋亡率分别为 16.67%、23.78%、33.98%,药物组与对照组差异有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );随着 TSPG 浓度升高,Survivin 基因的表达水平逐渐下调( $P < 0.05$ )。**结论** TSPG 可以抑制人白血病细胞的生长并诱导其凋亡,其机制可能与下调 Survivin 基因的表达有关。

**【关键词】** 人参总皂苷;K562 细胞;凋亡;生存素

**Effects of TSPG on apoptosis of K562 cells and the expression of Survivin** WU Dong-hong, YANG Zhi-gang, LI Qing-hua. Department of Hematology, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China

**【Abstract】 Objective** To study the effects of TSPG on apoptosis of K562 cells and the probable mechanism involved. **Methods** MTT was used to investigate the proliferation of K562 cells; Flow cytometry (FCM) was used to investigate the effects of TSPG on apoptosis of K562 cells; The expression of Survivin in K562 cells treated with different concentration of TSPG were examined by RT-PCR. **Results** The growth of K562 cells was inhibited by TSPG in the concentration dependent manner ( $P < 0.05$ ). FCM showed that the apoptosis rates of cells in 100  $\mu\text{g/L}$  (23.78%) and 200  $\mu\text{g/L}$  TSPG group (33.98%) were higher than those in 10  $\mu\text{g/L}$  TSPG group (16.67%), with significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The expression rates of Survivin were decreased by the treatment with the increasing concentrations of TSPG ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TSPG can restrain the human leukemic cell growth and induce cell apoptosis, which may be related to the decreased expressions of Survivin.

**【Key words】** Total saponins of panax ginseng; K562 cells; Apoptosis; Survivin

本实验拟通过观察人参总皂苷(TSPG)对人白

血病 K562 细胞凋亡的诱导作用及对生存素(Survivin)基因表达的影响,探讨其可能的作用机制。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1008-6706.2009.07.043

作者单位:524001 广东省湛江,广东医学院附属医院血液内科

## 1 材料与方法

1.1 材料 人白血病细胞株 K562 购自中国科学

作用大于胰岛素的降糖作用,引起血糖升高<sup>[2]</sup>。文献<sup>[3]</sup>报道不伴糖尿病的心肌梗死患者出现应激性高血糖提示预后不良,心律失常、充血性心力衰竭、心源性休克、住院死亡的危险性加大。本组资料提示 AMI 合并 SHG 组肌酸肌酶峰值高于非 SHG 组,说明 SHG 与 AMI 梗死面积有关。表 1 显示 AMI 伴 SHG 患者住院期间发生严重心律失常、心源性休克、充血性心力衰竭和死亡的发生率明显高于非 SHG 组( $P < 0.05$ )。

高血糖能够加重缺血性心肌损害,其原因可能是:(1)高血糖加剧缺血性心肌细胞水肿;(2)高血糖干扰缺血时局部心肌血流的恢复;(3)高血糖加剧自由基损伤;(4)高血糖可促发渗透性利尿,导致血容量下降和血流动力学改变,增加血液粘稠度,加

重微循环障碍;(5)患者可能存在潜在的胰岛细胞功能不全;(6)急性高血糖可导致内皮依赖性血管舒张功能减退,内皮细胞凋亡,血小板聚集和血粘度均明显增加<sup>[3]</sup>。

## 参考文献

- [1] Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al. Stress hyperglycemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without: a systematic overview. Lancet, 2000, 355 (9206): 773-778.
- [2] 邓小芳. 高血糖与心肌梗死. 广州医学院学报, 2000, 28 (4): 96-98.
- [3] 胡大一, 马长生. 心脏病学实践 2003. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 620-634.

(收稿日期: 2009-02-23)

(本文编辑: 张超)

院细胞研究所。TSPG 由广东医学院天然药物开发中心提供,纯度为 95% 以上,用 RPMI-1640 配制所需浓度。MTT、碘化丙锭 (PI) 购自美国 SIGMA 公司;新生小牛血清购自杭州四季青生物公司;RT-PCR 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;Survivin 及 GAPDH 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2 细胞培养 K562 细胞于 RPMI-1640 培养液中 (含 10% 新生小牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml,0.056% NaHCO<sub>3</sub>,调节 pH 值至 7.4),置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内常规培养。所有实验均用对数生长期的细胞。

1.3 MTT 法检测 K562 细胞生长影响 将对数生长期的 K562 细胞制备成  $4 \times 10^4$ /ml 单细胞悬液,按每孔 90  $\mu$ l 接种于 96 孔培养板,分别加入含 TSPG 培养液,使其终浓度为 0、10、100、200  $\mu$ g/ml。另设阴性对照组 (只加细胞和培养液,不加药物),空白调零组 (仅加培养液),各设 6 个复孔。在孵箱中分别 24、48、72 h 后,加入 MTT 100  $\mu$ l,培养 4 h,离心弃去液体,每孔加入 100  $\mu$ l DMSO 充分溶解 15 min。A570 nm 测定各孔光密度值 (A 值),按以下公式计算:细胞生长抑制率 (%) =  $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 将 K562 细胞制成  $1 \times 10^6$ /个细胞悬液,设对照组 (仅含等量的细胞和 RPMI-1640 液) 和实验组 (10、100、200  $\mu$ g/ml 的 TSPG 培养液),每组 3 个复孔。分别于 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h 后收集细胞;PBS 清洗、离心,用 0.5 ml PBS 将余下细胞制成均匀的细胞悬液;滴入预冷的 95% 乙醇 1.5 ml,吹打、固定 12 h;分析前将乙醇中的细胞悬液离心 (1 000 r/min, 5 min),加 PI 染色液 1 ml 置于室温 30 min;流式细胞仪分析。

1.5 RT-PCR 检测各组 Survivin mRNA 的表达 分别以 10、100、200  $\mu$ g/ml TSPG 作用 K562 细胞 24 h,以未加药细胞为对照组。按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,以 1  $\mu$ g RNA 为模板,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,并进行聚合酶链反应 (PCR)。PCR 条件为 94 ℃45 s,56 ℃45 s,72 ℃45 s,循环 30 次,末次延长 10 min。PCR 产物 5  $\mu$ l,加 6 $\times$  上样缓冲液 1  $\mu$ l 混匀,上样于 2% 琼脂糖凝胶,90 V 恒压电泳 90 min,溴乙锭紫外透射仪下拍照。采用图像分析软件 BandScan 5.0 比较电泳条带的相对光密度值,获得 Survivin mRNA 相对表达量。Survivin 长度为 401 bp,上游引物 5'-TTCTTG-GAGGGCTGCGCCT'-3,下游引物 5'-CCTGCTACTG-GTGCAGCCA'-3。

1.6 统计学方法 实验数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,应

用 SAS 8.1 软件包进行方差分析。 $P < 0.05$  为组间差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TSPG 对 K562 细胞生长的影响 MTT 法结果显示,TSPG 对 K562 细胞的抑制作用呈时间-剂量依赖关系。见图 1。

2.2 TSPG 对 K562 细胞凋亡的影响 经流式细胞仪检测,浓度为 0、10、100、200  $\mu$ g/L 的 TSPG 作用于 K562 细胞 24 h 后,细胞凋亡率分别为 0、 $(16.67 \pm 2.13)\%$ 、 $(23.78 \pm 2.90)\%$ 、 $(33.98 \pm 1.71)\%$ ,10、100、200  $\mu$ g/L 组与对照组相比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。随着 TSPG 浓度增加,亚二倍峰 (凋亡峰) 所占比例逐渐增大。

2.3 TSPG 对 Survivin mRNA 表达的影响 见图 2。

## 3 讨论

TSPG 是人参中主要的活性有效成分<sup>[1]</sup>。以往对 TSPG 抗肿瘤作用的研究大多局限于畸胎瘤细胞、卵巢癌细胞以及黑色素瘤细胞<sup>[2]</sup>。本研究应用不同浓度的 TSPG 作用于 K562 细胞,通过 MTT 比色法检测观察 TSPG 对 K562 细胞生长抑制的影响,发现 TSPG 能明显抑制 K562 细胞的增殖。在 TSPG 浓度为 10  $\mu$ g/L 时,已出现抑制细胞增殖作用,随着 TSPG 浓度的递增,增殖抑制率也逐渐增强 ( $P < 0.05$ )。

Survivin 在胚胎组织、转化细胞及多种肿瘤组织中表达,而在正常成人组织不表达或低表达,在基因诊断和靶向治疗中具有较大的研究价值<sup>[3]</sup>。研究表明 Survivin 高表达与某些肿瘤分化程度、预后不良相关<sup>[4]</sup>。本研究 RT-PCR 结果表明,随着 TSPG 浓度的增加,Survivin mRNA 的表达逐渐减少,各组间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

综上所述,TSPG 可抑制白血病细胞的生长和增殖,诱导其凋亡,这可能与下调 Survivin 基因的表达有关,但其具体机制尚需进一步研究。

(本文图 1、图 2 见插图 7-2)

## 参考文献

- [1] 王海南. 人参皂苷药理研究进展. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(11): 1201-1206.
- [2] Lee JH, Choi S, Kim JH, et al. Effects of ginsenosides on carbachol-stimulated formation of inositol phosphates in rat cortical cell cultures. Neurochem Res, 2003, 28(9): 1307-1313.
- [3] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter Survivin rates in colorectal cancer. Cancer Res, 1998, 58(22): 5071-5074.
- [4] Das A, Tan WL, Teo J, et al. Expression of Survivin in primary glioblastomas. J Cancer Res Clin Oncol, 2002, 128(6): 302-306.

(收稿日期: 2008-12-10)

(本文编辑: 张超)

# 前列腺特异性抗原检测诊断前列腺癌的价值

(正文见1212页)

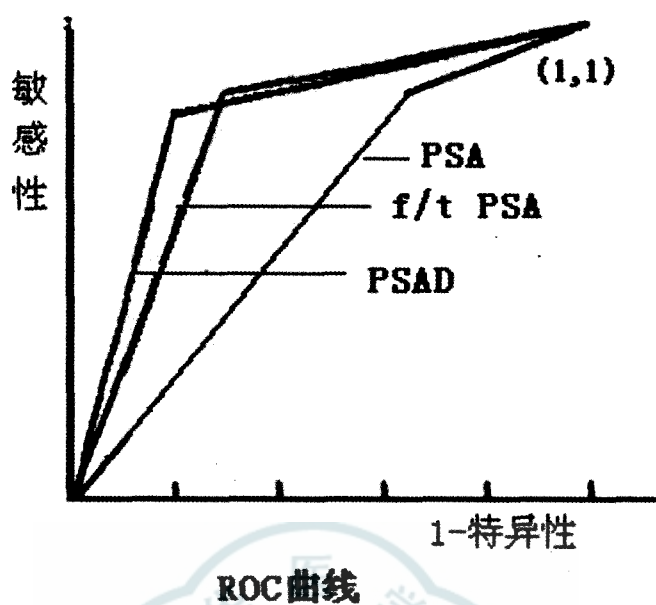


图1 PSA、PSAD、f/t PSA百分值用于PCA诊断的ROC曲线

## 人参总皂甙对白血病细胞K562凋亡及生存素表达的影响

(正文见1218页)

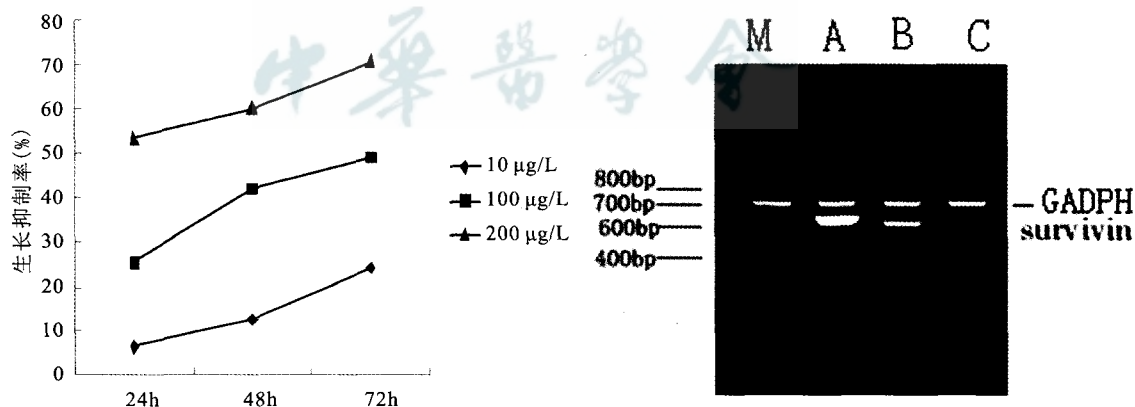


图1 人参总皂甙对K562细胞生长的影响

图2 TSPG对K562细胞中survivin mRNA表达的影响  
M: 100 bp DNA ladder A: 10 μg/L B: 100 μg/L C: 200 μg/L