

· 论 著 ·

人参皂苷诱导人 T 淋巴细胞白血病细胞株凋亡的研究

陈小红 高瑞兰 钱煦岱 金锦梅

【摘要】目的 通过观察人参皂苷(GS)诱导人 T 淋巴细胞白血病细胞株(Jurkat 细胞)凋亡,探讨 GS 影响 T 淋巴白血病细胞增生作用的机制。**方法** 选用人 T 淋巴细胞株(Jurkat 细胞)作靶细胞,采用 MTT 法和半固体集落培养法观察不同浓度的 GS 对 Jurkat 细胞增生的抑制效应;用 Annexin V-FITC 试验法分析 Jurkat 细胞的凋亡百分率,并进行 DNA 片段分析(DNA Ladder)。**结果** MTT 法和半固体集落培养法均显示 GS 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下能够明显抑制 Jurkat 细胞增生,并随浓度增加抑制作用增强;流式细胞术显示 GS 在一定浓度和时间范围内可引起细胞凋亡。**结论** GS 在一定浓度范围内可抑制 Jurkat 细胞增生,并能够诱导其凋亡,为临床应用提供理论依据。

【关键词】 人参皂苷; 细胞凋亡; Jurkat 细胞株

中图分类号:R73-35⁴ 文献标识码:A 文章编号:1009-9921(2005)04-0217-03

Study on effect of ginsenosides in inducing jurkat cell apoptosis CHEN Xiao-hong, GAO Rui-lan, QIAN Xu-dai, JIN Jin-mei. Institute of Hematology, Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China

【Abstract】Objective To investigate whether ginsenosides(GS) could induce Jurkat cells apoptosis to explore the mechanism of GS in T lymphocyte leukemia. **Methods** The inhibition effects of GS on Jurkat cell line were observed by using proliferation test of MTT and semi-solid colony formation. The apoptosis rate and DNA ladder were analyzed by Annexin-V FITC test, DNA Electrophoresis respectively. **Results** GS (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could inhibit the proliferation of Jurkat cells with significant difference between GS and non-GS control ($P < 0.05$) in both MTT test and colony assay. And the inhibition effects were increased by the concentration of GS. GS could induce Jurkat cells apoptosis in a certain scope of concentration and reacting time. **Conclusion** GS could inhibit the growth of Jurkat cells and induce them apoptosis, which provides an experimental basis for treatment of lymphocyte leukemia.

【Key words】 Ginsenosides; Apoptosis; Jurkat cell line

0 引言

近年来研究表明,人参皂苷(GS)具有刺激造血细胞增生,促进血细胞生成,抑制肿瘤细胞增生,诱导白血病细胞分化,增强机体免疫功能等多种作用^[1-3]。我们以往的实验表明 GS 可增强白血病细胞对化疗药物的敏感性^[4],并能诱导粒系白血病 HL-60 细胞凋亡^[5],但有关 GS 对 T 淋巴细胞白血病的作用报道较少。本组观察 GS 对 T 淋巴白血病 Jurkat 细胞抑制增生及诱导凋亡的作用,以了解 GS 抗淋巴系白血病细胞的效应。

1 材料与方法

1.1 药物 GS 干燥粉剂由本院中药研究室提供,纯度为 86.5%。用 RPMI1640(Gibco 公司)培养液配成所需浓度的工作液,正压过滤除菌,4℃保存备用。

1.2 MTT 比色法检测细胞增生 取对数生长期的 Jurkat 细胞,调整细胞浓度至 $10^4/\text{mL}$,分别接种于

无菌 96 孔板,0.2 mL/孔。实验组加 GS,终浓度分别为 20,50,100 mg/L。对照组不加 GS,每组设 4 个重复孔,置于 37℃,5.0% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后,每孔加入 20 μL MTT (5 g/L,上海生工生物工程技术服务有限公司)反应液孵育 4 h,去上清后加入 150 μL DMSO (Sigma)终止反应,微振荡 10 min,置酶标仪 570 nm 波长处测吸光度(A)。

1.3 半固体集落培养法 取对数生长期的 Jurkat 细胞作半固体集落培养,RPMI1640 培养体系含 10% FCS(杭州四季青生物有限公司)、0.3% 琼脂(Gibco 公司)和 10^3 细胞/0.5 mL,0.5 mL/孔,接种于无菌 24 孔培养板,加 GS 作为实验组,终浓度分别为 20,50,100 mg/L,以不加 GS 为对照组,均置于 37℃,5.0% CO₂ 培养箱中培养 10 d,计数集落数(>40 个细胞)。

1.4 Annexin V 分析凋亡细胞的百分率^[5] 经不同浓度的 GS 处理 48 h 后,收集细胞 1×10^5 ,冷 PBS 洗涤后,重新悬浮于 100 μL Binding 缓冲液中(10 mmol/L HEPES/NaOH,140 mmol/L NaCl,

作者单位:310006 杭州,浙江省中医院血液病研究所

通讯作者:高瑞兰,Email:zphmcm@mail.hz.zj.cn

2.5 mmol / L CaCl_2 , pH 7.4), 分别加入 5 μL Annexin V-FITC (联科生物技术有限公司) 和 10 μL PI 液, 轻轻混匀后, 室温避光作用 15 min, 再加入 400 μL Binding 缓冲液孵育, 于 1 h 内用流式细胞仪分析。

1.5 DNA 片段分析 参照文献[5]方法, GS 处理 48 h 后, 收集 5×10^6 细胞, 经冷 PBS 洗涤后, 加入 50 μL 细胞裂解液 (1% NP-40, 0.5 mol / L EDTA, 1 mol / L Tris-HCl pH 7.5) 作用后收集上清, 沉淀物再重复提取 1 次, 合并上清共 100 μL , 加入 0.3 μg RNAaseA 和终浓度为 1% 的 SDS, 56 $^\circ\text{C}$ 水浴作用 2 h, 然后加入终浓度为 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 蛋白酶 K, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴作用 3 h, 加入 1 / 10 体积的 3 mol / L 乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^\circ\text{C}$ 过夜沉淀 DNA, 离心弃上清, 空气干燥。再加入 10 μL TE 缓冲液 (10 mmol / L Tris HCl, 1 mol / L EDTA, pH 8.0), 56 $^\circ\text{C}$ 水浴溶解 DNA 30 min, 加样至 1.2% 琼脂糖凝胶上, 电泳 2~3 h, 紫外线下观察并摄影。同样实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 t 检验。

2 结果

2.1 MTT 比色法分析 GS 抑制 Jurkat 细胞增生的作用 当 GS 浓度 $\geq 50 \mu\text{g} / \text{mL}$ 时, 其吸光度均明显低于对照组, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 提示 GS 在一定浓度下能明显抑制 Jurkat 细胞增生 (见表 1)。

表 1 MTT 法观察 GS 对 Jurkat 细胞抑制作用 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

GS 浓度 mg / L	A_{570}	P 值
0	0.66 ± 0.07	
20	0.56 ± 0.11	> 0.05
50	0.49 ± 0.05	< 0.05
100	0.38 ± 0.03	< 0.01

2.2 半固体集落培养法观察 GS 抑制 Jurkat 细胞集落形成的影响 半固体集落培养结果与 MTT 法相同, GS 在 50 mg / L 时能够明显抑制 Jurkat 细胞增生, 其集落数明显低于对照组, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 并随 GS 浓度增加抑制作用更强 (见表 2)。

表 2 GS 对 Jurkat 细胞集落形成的抑制作用 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

GS 浓度 mg / L	集落数	P 值
0	78.98 ± 12.38	
20	71.13 ± 11.71	> 0.05
50	50.38 ± 14.96	< 0.05
100	10.13 ± 4.44	< 0.01

2.3 GS 诱导 Jurkat 细胞凋亡的 Annexin V 分析结果 不同浓度的 GS 作用 48 h 后 Annexin V-FITC 分析结果显示, GS 20, 50, 100 mg / L 的细胞凋亡率分别为 5.25%、7.82% 和 10.95%, 而对照组为 0.47%,

Jurkat 细胞经 GS 处理后凋亡明显增多 (见图 1)。

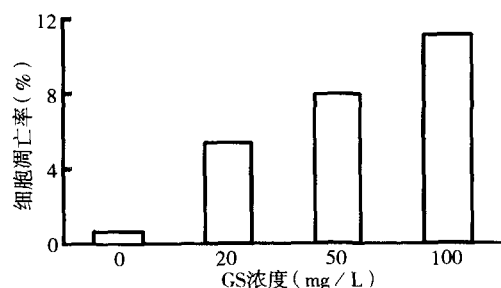
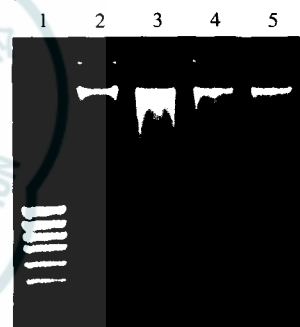


图 1 不同浓度的 GS 作用 Jurkat 细胞 48 h 的 Annexin V 阳性结果

2.4 GS 诱导 Jurkat 细胞凋亡的 DNA 片段结果 Jurkat 细胞 GS 处理 48 h 后, 出现典型的 DNA 梯形条带, 提示 GS 可激活细胞内源性核酸内切酶活性, 将核小体之间的 DNA 切割形成 180~200 bp 整数倍的不同长度的 DNA 片段 (见图 2)。



1—1: Marker (100 bp); 2—2: 无 GS 的对照组细胞; 3—3~5: 20, 50, 100 mg / L 的 GS 作用细胞 48 h

图 2 不同浓度的 GS 作用 Jurkat 细胞 48 h 后 DNA 片段结果

3 讨论

细胞凋亡是一种主动的、高度有序的基因控制的、一系列酶参与的死亡过程。正常情况下细胞增生与细胞凋亡之间保持着一种动态平衡, 这种平衡是维持多细胞生物自身稳定的重要因素。当造血细胞增生失控或凋亡受阻都可导致白血病的发生, 因此抑制失控的造血细胞增生或诱导失调控造血细胞凋亡是解决白血病发生的有效途径。在细胞凋亡早期, 细胞表面发生变化, 细胞膜内部的磷脂酰丝氨酸 (PS) 可迁移到细胞外层表面。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的、对 PS 有高度亲和力的磷脂结合蛋白, 可作为探针识别细胞膜表面是否有 PS, 从而识别凋亡细胞。细胞发生凋亡的另一特征是: 细胞凋亡时, 细胞内核酸内切酶被激活, 可导致染色体 DNA 广泛断裂, 出现 180~200 bp 整数倍不同长度的 DNA 片段, 在琼脂糖凝胶电泳图上出现梯形条带。

我们曾报道低浓度的 GS 能刺激正常和白血病

祖细胞在体外增生,使集落数明显增加;但随 GS 浓度的增高,其仍能轻度地提高正常 CFU-GM 祖细胞集落数,可是对白血病祖细胞集落的生长起明显抑制作用^[1,2]。为了解 GS 抑制白血病祖细胞增生的作用,我们对粒细胞性白血病 HL-60 细胞进行了研究,结果表明用一定浓度的 GS 处理 HL-60 细胞后可诱导 HL-60 细胞凋亡^[5],但对 T 淋巴细胞白血病细胞的作用研究较少。因此本组选用人 T 淋巴系白血病 Jurkat 细胞株作为靶细胞,观察 GS 对其增生抑制和诱导凋亡的作用,结果显示当 GS $\geq 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MTT 比色法和半固体集落培养均显示 GS 对 Jurkat 细胞起明显的抑制作用($P < 0.05$);Annexin V 测定和 DNA 片段分析结果显示 GS 作用 48 h 后可诱导 Jurkat 细胞凋亡,其中 20 mg/L GS 虽能诱导细胞出现梯形条带,但在 MTT 比色法和半固体培养中均显示与对照组差异无显著性,这可能与 Jurkat 存活细胞百分率较高有关。

Xing 等^[6]用人参皂苷对 35 例直肠癌患者行灌肠术,结果显示有 23 例患者的肿瘤细胞均出现凋亡,占 65.7%。Popovich 等^[7]发现人参皂苷中结构不同的成分对 THP-1 细胞的凋亡作用也不一致,带有糖基修饰的结构如人参二醇等作用明显差于不

带糖基的结构,如 Rh2。由此可知人参皂苷可诱导不同细胞凋亡,而对其作用机制的研究也不尽相同,大部分的研究集中在 bcl-2 和 bax 基因表达的差异上,导致 bcl-2/bax 比值增高,即 bcl-2 基因表达下降,抗凋亡作用减弱。至于人参皂苷诱导 Jurkat 细胞凋亡的机制还有待于我们进一步的研究。

参考文献

- 1 高瑞兰,徐从连,金锦梅,等. 人参总皂甙对正常人和再生障碍性贫血患者造血祖细胞的刺激增生作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(5): 285-287.
- 2 高瑞兰,牛泱平,Chong BH. 人参总皂甙对白血病细胞作用的实验观察[J]. 上海中医药杂志, 1999, 9(1): 46-48.
- 3 易永林,李薇,郝秀智. 人参茎叶总皂甙对 58 例急性非淋巴细胞白血病的诱导分化作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(12): 722-724.
- 4 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): 19-21.
- 5 牛泱平,高瑞兰, Helen Tao, 等. 人参皂甙诱导 HL-60 细胞凋亡的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(6): 450-452.
- 6 Xing J H, Chen Y Q, Ji M X. Clinical study on effect of ginsenoside in inducing rectal cancer cell apoptosis [J]. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi, 2001, 21(4): 260-261.
- 7 Popovich D G, Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line[J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 406(1): 1-8.

作者简介:陈小红(1972—),男,2003年毕业于浙江中医药大学,硕士,助理研究员。

(收稿日期:2004-09-29;修回日期:2005-04-22)

(本文编辑:白润萍 校对:李旭清)

(上接第 216 页)

在 CML 的发生、发展中以往的研究仅局限于单基因,往往仅能解释某一部分 CML 急变的发生, CML 急变是一多基因事件,包括癌基因、抑癌基因和其他基因的量和质的异常。因此分离、克隆 CML 发生发展过程中关键异常表达的基因,可以从分子水平进一步阐明 CML 发病的分子机制,并为疾病的早期诊断和基因治疗提供特异的靶点。

PTTG 是 Pei 等^[2]在垂体瘤细胞中发现并命名的一种新的肿瘤转化基因,在正常垂体细胞中不表达。大量研究显示,这一新基因在大多数正常成人组织只有弱表达甚至检测不到,但是在肿瘤组织及肿瘤细胞系,如乳腺癌、结肠癌、肝癌中表达明显升高。肿瘤的发生是在多基因、多步骤下发生的,PTTG 与大多数肿瘤发生有密切关系^[3-6]。

为了研究 PTTG 基因在 CML 中的表达情况,我们用半定量 RT-PCR 方法检测 34 例不同临床分期的 CML 患者骨髓单个核细胞 PTTG 基因的表达,结果显示 PTTG 基因在 CML 慢性期、加速期和急变期中均高表达,明显高于正常对照,推测 PTTG 基因的过度表达参与了 CML 的发生。PTTG 基因在加速期

和急变期的表达明显高于慢性期,这可能与 PTTG 促进细胞增生有关,说明 PTTG 基因过度表达与 CML 病情进展或慢粒急变有关,检测 PTTG 的改变对于预测 CML 急变很有意义。PTTG 有可能成为一种新的肿瘤标志物。

参考文献

- 1 Dominguez A, Ramos-Morales F, Romero F, et al. hPTTG, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG[J]. Oncogene, 1998, 17:2187-2193.
- 2 Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene(PTTG)[J]. Mol Endocrinol, 1997, 11:433-441.
- 3 Zhang X, Horwitz G A, Prezant T R, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG)[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(1): 156-166.
- 4 Kakar S S. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG)[J]. Gene, 1999, 240(2): 317-324.
- 5 Kanakis D, Kirches E, Mawrin C, et al. Promoter mutations are no major cause of PTTG overexpression in pituitary adenomas [J]. Clin Endocrinol, 2003, 58(2):151-155.
- 6 Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product[J]. J Biol Chem, 2000, 275(25):19422-19427.

作者简介:丛雅琴(1952—),女,1975年毕业于潍坊医学院,学士,主任医师,硕士研究生导师。

(收稿日期:2005-02-07;修回日期:2005-05-09)

(本文编辑:李旭清 校对:李旭清)