文章编号:1000-5404(2005)06-0517-04

论著

人参多糖对K562细胞增殖抑制及诱导分化的实验研究

陈地龙,刘永刚,王亚平,陈婷梅,郑 敏,姜 蓉 (重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆市生物化学与分子药理学实验室,重庆 400016)

提 要: 目的 研究人参多糖(GPS)对人白血病细胞株(K562)增殖抑制及诱导分化的影响。**方法** 采用细胞体外培养技术,MTT法检测细胞增殖抑制,光镜和电镜观察细胞形态变化;联苯胺(Benzidine)、糖原染色(PAS)、过氧化物酶(POX)、非特异性脂酶(α-NAE)细胞化学染色分别检测K562细胞向红系、粒系、巨核系分化的特征;免疫细胞化学检测细胞表面分化抗原及因子表达(CD_{14}、CD_{15}、HIR_2、EPO、GM-CSF);FAS及FAS-L等检测细胞凋亡情况。**结果** GPS对K562细胞的增殖有明显抑制作用并能诱导K562细胞向红系或粒系细胞分化,表现为:①K562细胞的增殖受到抑制;②K562细胞形态学上可见细胞体积缩小,核直径减小,核仁减少或消失,核染色质浓缩,胞浆丰富,核浆比例降低,可见中晚期粒、红系细胞;③K562细胞血红蛋白(Hb)、糖原、α-NAE的表达明显增加,而过氧化物酶(POX)的表达与对照无显著性差异;④细胞表面分化抗原CD_{15}、HIR_2、EPO、GM-CSF的表达明显增强,CD_{14}的表达与对照无显著性差异;⑤细胞凋亡明显增加。**结论** 人参多糖(GPS)能明显抑制K562细胞增殖并能诱导其凋亡并使K562细胞向成熟方向分化。

关键词: 人参多糖;K562;增殖抑制;诱导分化
中图法分类号: R282.71; R73-354; R733.73 **文献标识码**: A

Effects of Ginseng polysaccharide on proliferation and differentiation of K562 cells

CHEN Di-long, LIU Yong-gang, WANG Ya-ping, CHEN Ting-mei, ZHENG Min, JIANG Rong (Department of Histology and Embryology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects of ginseng polysaccharide (GPS) on the proliferation and differentiation of K562 cells. **Methods** *In vitro* cell culture, MTT, morphological observation, and cytochemistry were used to observe the features of erythroid, granulocytic, and megakaryocytic lineage differentiated from K562 cells. We used Fas and Fas-L to observe the apoptosis of K562 cells. **Results** GPS could significantly inhibit the proliferation and promote differentiation of K562 cells into the granulocytes or erythrocyte *in vitro*: ① The proliferation of K562 cells was inhibited; ② The morphological feature of K562 cells tended to be more mature; ③ GPS could remarkably promote the expressions of hemoglobin, PAS, and α-NAE in K562 cells; ④ The expressions of CD_{14}, CD_{15}, HIR_2, EPO, and GM-CSF increased in K562 cells treated with GPS; ⑤ The apoptosis of K562 cells treated with GPS increased significantly. **Conclusion** GPS can restrain the proliferation and promote differentiation of K562 cells.

Key words: ginseng polysaccharide; K562; proliferation inhibition; differentiation

白血病是严重危害人类生命健康的造血系统恶性肿瘤,迄今白血病的治疗仍主要采用传统的联合化疗,但此疗法副作用甚大,复发率高,尤其对机体免疫与造血系统有较大的损害。人参是祖国传统医学的"补气"要药,有补气生血之功效,人参多糖(Ginseng polysaccharide, GPS)是人参的主要成分之一,我们既往的研究表明[1~3],GPS能促进正常血细胞生成,并能抑制白血病细胞的增殖,但这种双向调控的机制尚不清楚。本研究采用实验血液学技术,研究GPS对人红白血病细胞(K562)的增殖抑制和诱导分化作用,旨在阐述人参对血细胞发生的调控机制,为研制开发天然中药分化诱导剂提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 人参多糖(GPS)

重庆中药研究所提供(纯度98%),以RPMI1640培养液配制成所需浓度(5 mg/ml),过滤除菌。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670880)、重庆市教委资助课题(2002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670880) and the Chongqing Municipal Educational Commission (2002)

作者简介:陈地龙(1971-),男,重庆市万州县人,博士研究生,讲师,主要从事造血调控机制方面的研究。电话:(023)68485614, E-mail: chendilong@21cn.com

收稿日期:2004-09-02;修回日期:2005-01-28

1.2 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)

购自北京北医联合生物工程公司,活性 1×10^7 IU/mg。RPMI1640 培养液稀释为 1×10^4 IU/ml。

1.3 促红细胞生成素(EPO)

美国 Amgen 公司产品,活性 10^5 IU/ml。RPMI1640 培养液稀释为 100 μg/ml。

1.4 K562 细胞(人红白血病细胞株)

本校检验系实验室惠赠,在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中常规培养,每 2~3 天换液传代。

1.5 主要药品与试剂

RPMI1640 培养基,美国 GIBGO 公司产品;小牛血清(BS),杭州四季清公司;大鼠抗人 EPO 受体单克隆抗体(1:200),晶美生物工程有限公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT),美国 Mluka 公司产品;二甲亚砜(DMSO),美国 Merk 产品;大鼠抗人 GM-CSF 受体单克隆抗体(1:200),美国 Pharmingen 公司产品;小鼠抗人 CD_{14}、CD_{15} 单克隆抗体(1:200),北京中山生物技术公司产品;抗人血型糖蛋白-2(HIR_2)单克隆抗体(1:100),军事医学科学院产品;DAB 试剂盒,北京中山生物技术有限公司产品。

1.6 增殖抑制及诱导分化实验

1.6.1 GPS 对 K562 细胞增殖抑制的研究 取处于对数生长期的 K562 细胞培养进行增殖抑制实验。对照组:常规培养;GPS 组:在 96 孔板培养体系中加入 GPS(终浓度分别为 0、1、10、20、40、80、100 μg/ml)。分别在培养第 1、2、3、4、5、6 天取样,上酶标仪(波长 570 nm)。根据测定的吸光值观察不同药物浓度作用不同时间对细胞增殖的影响。

1.6.2 GPS 对 K562 细胞诱导分化的光镜形态学观察 取处于对数生长期的 K562 细胞培养进行诱导分化实验。对照组:常规培养;GPS 组:培养体系中加入 GPS(终浓度为 40 μg/ml)。分别在培养第 3、6 天取样,经细胞离心涂片后进行 Wright's 染色,光镜下观察细胞形态,同时每例用图像分析仪随机测量 300 个细胞的体积、直径,计算核/质比值。

1.6.3 GPS 诱导后 K562 细胞超微结构观察 取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养,实验分组同 1.6.2,在培养第 6 天取样,经 2.5% 戊二醛固定 1 h,电镜常规超薄切片制备,H-600 型透射电镜观察与摄片。

1.6.4 GPS 诱导 K562 细胞的细胞化学检测 按 1.6.2 分组培养 K562 细胞,细胞经离心涂片,以大鼠抗人 CD_{14}、CD_{15}、GM-CSF、EPO、HIR_2 单克隆抗体进行免疫细胞化学 S-P 法染色,每例用图像分析仪计数 300 个细胞,计算阳性细胞表达率。

1.6.5 GPS 诱导 K562 细胞表面抗原标志检测 按 1.6.2 分组培养 K562 细胞,细胞经离心涂片,分别进行联苯胺染色,POX 染色、α-NAE 细胞化学染色,每例用图像分析仪计数 300 个细胞,计算阳性细胞表达率。

1.6.6 GPS 诱导 K562 细胞凋亡检测 按 1.6.2 分组培养 K562 细胞,细胞经离心涂片,以大鼠抗人 FAS、FAS-L 单克隆抗体进行免疫细胞化学 S-P 法染色,每例用图像分析仪计数 300 个细胞,计算阳性细胞表达率。

1.7 统计学处理

采用 SAS 统计软件进行方差分析、q 检验。

2 结果

2.1 GPS 对 K562 细胞增殖抑制的研究

随着加入 GPS 浓度的增加和培养时间的延长,细胞增殖抑制越明显,根据 MTT 方法所测的 $D(570)$ 值分析,确定 40 μg/ml 为最适药物浓度(表 1)。

表 1 不同浓度和不同作用时间 GPS 对 K562 细胞增殖的影响 [$D(570)$, $n=5$, $\bar{x}\pm s$]

Tab 1 Effects of GPS on the proliferation of K562 cells [$D(570)$, $n=5$, $\bar{x}\pm s$]

Concentration of GPS (μg/ml)	Time of culture(d)					
	1	2	3	4	5	6
0	1.132±0.034	1.841±0.045	5.085±1.165	6.133±1.835	7.726±2.126	7.142±2.894
1	1.257±0.031	1.000±0.039	4.899±1.098	5.455±1.219	6.105±2.034	7.468±2.539
10	0.996±0.037	0.908±0.024*	4.248±1.035	5.735±1.164	5.264±1.439*	6.66±1.243
20	0.878±0.041*	0.915±0.012*	4.061±1.023*	5.046±2.058*	5.568±1.834*	5.598±1.279*
40	0.725±0.022*	0.703±0.009**	3.853±1.037**	4.758±1.087**	4.726±1.531**	4.751±1.138**
80	0.669±0.034**	0.715±0.027**	3.942±1.042**	4.503±1.259**	3.534±1.064**	4.735±1.324**
100	0.671±0.021**	0.613±0.073**	3.05±0.846**	4.045±1.138**	3.128±1.066**	1.395±0.059**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* 0 μg/ml GPS

2.2 GPS 对 K562 细胞诱导的形态学影响

对照组 K562 细胞体积较大,核大而明显,核仁清楚,核质比例大,胞质强嗜碱性,无特殊颗粒(图 1)。经 GPS(20、40 μg/ml)诱导 6 d 后,可见细胞体积缩小,核直径减小,核仁体积变小、数量减少或消失,核染色质浓缩,胞质丰富,核浆比例降低。GPS 诱导 6 d 后,K562 细胞直径和体积有进一步变小的趋势(表 2);细胞向成熟方向分化趋势更明显,经 GPS 作用后的 K562 细胞可见中晚期粒、红细胞(图 2~4)。

表 2 GPS 对 K562 细胞形态分化的影响 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of GPS on the morphological differentiation of K562 cells ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Distinguished feature	Cell diameter (μm)	Cell volume (μm²)	Nucleus/cytoplasm ratio(%)
Control	36.11±6.84	821.13±281.11	85.00±18.00
GPS 3 d	20.67±3.13	387.23±80.21**	65.00±16.00*
GPS 6 d	21.68±2.77	342.12±78.45**	62.00±9.00**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control. Final concentration of GPS: 40 μg/ml

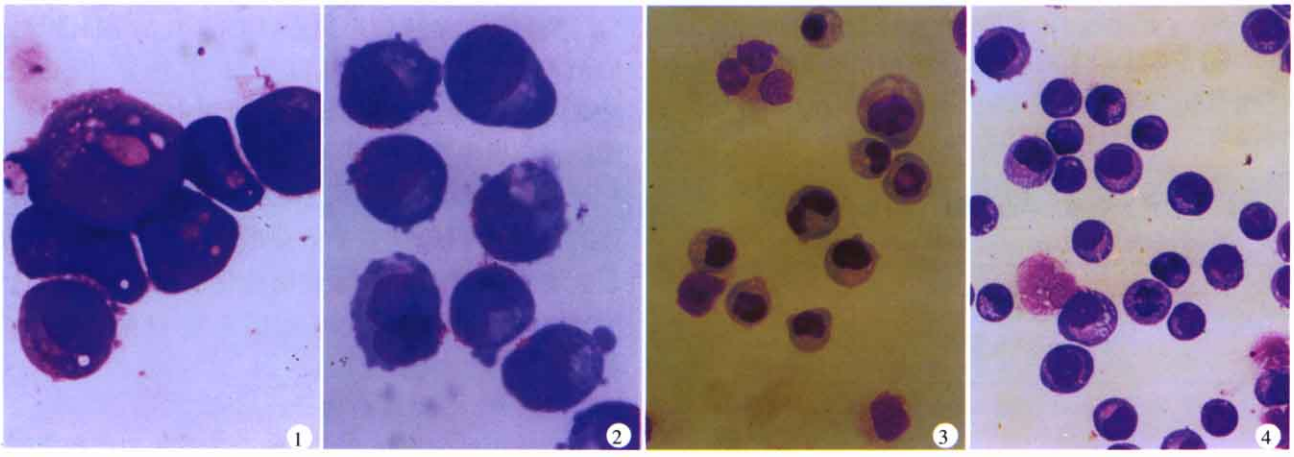


图 1　对照组 K562 细胞　（瑞氏染色 × 1 000）

Fig 1　K562 cells of control　（Wright's staining × 1 000）

图 2　GPS(40 μg/ml)诱导 3 d K562 细胞　（瑞氏染色 × 1 000）

Fig 2　K562 cells induced by GPS (40 μg/ml) for 3 d　（Wright's staining × 1 000）

图 3　GPS(40 μg/ml)诱导 5 d K562 细胞　（瑞氏染色 × 400）

Fig 3　K562 cells induced by GPS (40 μg/ml) for 5 d　（Wright's staining × 400）

图 4　GPS(40 μg/ml)诱导 6 d K562 细胞　（瑞氏染色 × 400）

Fig 4　K562 cells induced by GPS (40 μg/ml) for 6 d　（Wright's staining × 400）

GPS 诱导 K562 细胞后，电镜观察可见细胞体积明显缩小，核内异染色质增多，电子密度增加，核仁减小或消失，胞质增多，胞质中内质网、高尔基氏体、核糖体等细胞器增加，出现溶酶体，也可见血红蛋白颗粒，部分细胞呈中、晚幼红细胞及粒单系早、中期细胞变化并可见凋亡细胞(图 5,6)。

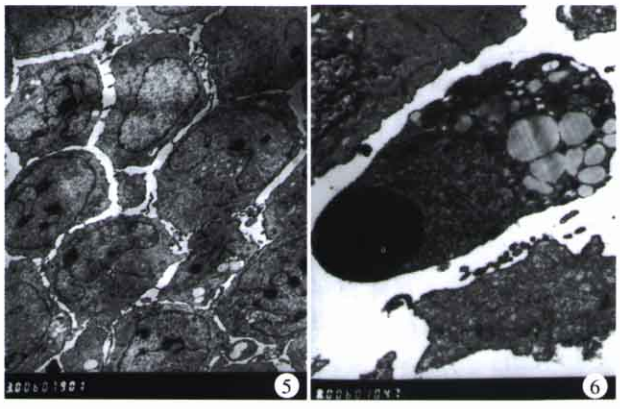


图 5　对照 K562 细胞　（TEM × 3 000）

Fig 5　K562 cells in the control group　（TEM × 3 000）

图 6　GPS(40 μg/ml)诱导 K562 细胞 6 d　（TEM × 8 000）

Fig 6　K562 cells induced by GPS (40 μg/ml) for 6 d　（TEM × 8 000）

2.3　GPS 诱导 K562 细胞分化的细胞化学改变

未经 GPS 作用的 K562 细胞联苯胺染色反应阳性率为 2%，糖原染色(PAS)反应阳性率 17%，POX 反应阳性率为 18%，非特异性脂酶(α-NAE)反应阳性率为 8%。经 GPS(40 μg/ml)诱导 K562 细胞 6 d 后血红蛋白、糖原、α-NAE、过氧化物酶均有所提高，联苯胺染色阳性率提高到 22%，糖原染色阳性率提高到 46%，α-NAE 染色阳性率提高到 52%与对照组相比有明显差异(表 3)，POX 阳性率提高到 28%与对照组相比无显著性差异。

表 3　GPS 对 K562 细胞 Hb、PAS、POX、α-NAE 表达的影响
($n = 8$, %, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Effects of GPS on the expressions of Hb, PAS, POX, and α-NAE in K562 cells ($n = 8$, %, $\bar{x} \pm s$)

Group	Benzidine reaction	PAS reaction	POX reaction	α-NAE reaction
Control	2 ± 0.9	17 ± 2.1	18 ± 1.7	8 ± 1.3
GPS 3 d	15 ± 4.5**	33 ± 5.7*	28 ± 10.2	44 ± 2.9**
GPS 6 d	22 ± 4.1**	46 ± 7.1**	22 ± 6.6	52 ± 3.3**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* control. Final concentration of GPS: 40 μg/ml

2.4　GPS 诱导对 K562 细胞分化抗原表达的影响

GPS(40 μg/ml)诱导 K562 细胞 3、6 d，利用免疫细胞化学检测细胞表面分化抗原、图像分析仪计算 CD_{14}、CD_{15}、EPO、GM-CSF、HIR_2 阳性率，结果显示：CD_{15}、EPO、GM-CSF、HIR_2 表达明显提高，CD_{14} 表达的增强与对照相比无统计学意义($P > 0.05$)(表 4)。

表 4　GPS 对 K562 细胞 CD_{14}、CD_{15}、EPO、GM-CSF、HIR_2 表达的影响 ($n = 10$, %, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4　Effects of GPS on expressions of CD_{14}, CD_{15}, EPO, GM-CSF, and HIR_2 in K562 cells ($n = 10$, %, $\bar{x} \pm s$)

Group	CD_{14}	CD_{15}	EPO	GM-CSF	HIR_2
Control	1.67 ± 0.67	2.76 ± 1.34	21.05 ± 4.38	19.66 ± 4.17	9.15 ± 2.18
GPS 3 d	2.91 ± 1.14	9.17 ± 3.53**	58.10 ± 12.31**	32.38 ± 9.16*	41.86 ± 3.93**
GPS 6 d	3.21 ± 2.45	11.37 ± 3.79**	73.45 ± 13.39	41.25 ± 6.76**	56.77 ± 8.78**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* control. Final concentration of GPS: 40 μg/ml

2.5 GPS 对 K562 凋亡的影响

GPS 诱导 K562 细胞 6 d,利用免疫细胞化学检测细胞表面 Fas 受体、Fas 配体(Fas-L),结果显示:经 GPS 诱导后 K562 细胞,光镜和电镜均出现凋亡小体,Fas 受体表达明显增强,Fas 配体表达也有增强,但与对照相比无显著性差异(表 5)。

表 5 GPS 对 K562 细胞凋亡的影响 ($n=10$, %, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5 Effects of GPS on apoptosis of K562 cells ($n=10$, %, $\bar{x}\pm s$)

Group	Fas	Fas-L
Control	10.05±3.17	27.89±3.51
GPS 3 d	67.75±7.13**	36.16±6.26
GPS 6 d	81.55±9.38**△△	34.69±8.69

**: $P<0.01$, *vs* control. Final concentration of GPS: 40 μg/ml

3 讨论

白血病细胞的诱导分化及逆转机制研究已成为当今生物医学领域内最热点的课题之一[4,5]。白血病是严重危害人类生命健康的造血系统恶性肿瘤,其生物学特征是造血细胞增殖失控,分化成熟受阻,正常凋亡过程障碍,而造成异常分化细胞大量增殖。目前,白血病的治疗仍采用传统的大剂量联合化疗,但此疗法副作用大,复发率高,尤其对机体免疫与造血系统有很大损害。从祖国医学宝库中寻找抑制白血病细胞恶性增殖并诱导其向成熟方向分化的中药诱导分化剂是值得探索的途径之一。人参作为传统医学的"补气"要药已有数千年的临床应用历史,人参多糖(GPS)是其主要有效药物成分之一。我们用 GPS 诱导 K562 细胞,对其增殖抑制情况,形态学、细胞化学、细胞表面分化抗原,凋亡等方面进行了探讨。

3.1 GPS 对 K562 细胞增殖的影响

本室既往研究表明[2,3],GPS 对正常造血祖细胞有增殖作用。GPS 对 K562 细胞有明显的增殖抑制作用,随着加入 GPS 浓度的增加和培养时间的延长,细胞增殖抑制越明显。根据以上实验结果,我们认为 GPS 是既能促进正常造血又能抑制白血病细胞增殖的天然药物,具有双向调控作用,有深入研究的价值和广阔的临床应用前景。

3.2 GPS 对 K562 细胞诱导分化的作用

未经诱导的 K562 细胞表现为原始、低分化细胞,细胞体积大,染色质疏散(核淡染),胞质少,核大,核仁清楚,核质比例大,胞质内无特殊颗粒。超微结构见细胞核内常染色质多,核仁清楚,胞质内可见内质网、高尔基氏体、核糖体等细胞器。GPS(40 μg/ml)诱导 K562 细胞后,细胞体积变小,核质比例减小,可见"杆状核",电镜可见细胞异染色质增多,胞质内可见大量溶酶体、血红蛋白(Hb)。从形态上提示趋向红、粒系细胞分化。

细胞化学染色结果提示:GPS (40 μg/ml)诱导后,K562 细胞糖原(PAS)、血红蛋白、非特异性酯酶(α-NAE)染色均增强,而过氧化物酶变化无显著性差异。细胞表面抗原检测结果表明:K562 细胞中红系表面分化抗原 HIR_2、EPO 表达增强,且随着时间延长,表达增强的程度也增加;向粒系分化的抗原 CD_{15}、GM-CSF 的表达增强;而单核细胞系表面分化抗原 CD_{14} 的表达无明显变化。我们认为 GPS 能诱导 K562 细胞向红系、粒系、巨核系方向分化。

3.3 GPS 对 K562 细胞凋亡的影响

由体内外因素触发的细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程称为细胞凋亡。如机体正常的凋亡程序紊乱,就会导致多种疾病发生,如肿瘤。白血病发生的重要因素之一就是正常凋亡过程障碍。Fas 是细胞表面受体,Fas 基因对细胞凋亡有促进作用,Fas 抗体能诱导细胞凋亡是因为 Fas 抗原作为细胞表面受体,通过信号转导,最终诱发凋亡。本实验用免疫细胞化学检测经 GPS(40 μg/ml)诱导的 K562 细胞表明,Fas 的表达明显增强,而且随着时间延长而表达增强,而 Fas-L 的表达变化无显著性差异。同时光镜、电镜均可见经 GPS 诱导后的 K562 细胞出现凋亡小体。故 GPS 能诱导 K562 细胞发生凋亡。

我们既往研究表明 GPS 能促进造血干/祖细胞增殖,本研究证实 GPS 能抑制白血病细胞的增殖,并能诱导其向红系、粒系方向分化,提示 GPS 有可能成为既促进正常造血,又能抑制白血病细胞增殖,并能诱导其向成熟方向分化及发生凋亡的天然诱导剂,成为一种能双向调控的药物,具有深入研究的价值。

参考文献:

[1] 陈地龙, 王亚平, 陈婷梅. 人参皂甙协同 EPO 和 GM-CSF 对 K562 细胞诱导分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(22): 2018-2021.

[2] 戴 勤, 王亚平, 周开昭, 等. 人参多糖对人早幼粒白血病细胞株(HL-60)增殖的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2001, 26(2): 126-129.

[3] 陈婷梅, 王亚平. 人参总皂甙对 K_{562} 增殖抑制与诱导分化的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 1999, 24(2): 115-199.

[4] Rath A V, Schmahl G E, Niemeyer C M. Expression of transcription factors during sodium phenylacetate induced erythroid differentiation in K562 cells[J]. Blood Cells Mol Dis, 1997, 23(2): 27-38.

[5] Aoki S, Kong D, Matsui K, *et al*. Smenospongine, a spongean sesquiterpene aminoquinone, induces erythroid differentiation in K562 cells[J]. Anticancer Drugs, 2004, 15(4): 363-369.

(编辑 汪勤俭)