文章编号:1000-5404(2005)06-0525-04

论著

人参皂甙诱导白血病细胞凋亡及对 Fas、FasL 表达的影响

曹唯希[1],王亚平[2],刘 琼[3],姜 蓉[2],陈婷梅[1] (重庆医科大学:[1]重庆市临床检验诊断学重点实验室,[2]组织胚胎学教研室,重庆 400016;[3]重庆市中医研究所,重庆 400010)

提 要:目的 研究人参总皂甙诱导白血病细胞凋亡及其机制,为进一步开发人参皂甙提供理论与实验依据。**方法** 采用图像分析术、流式细胞术、形态学观察与免疫细胞化学等方法,研究人参总皂甙诱导 K562 细胞凋亡。**结果** 人参总皂甙对 K562 细胞有增殖抑制作用,并可诱导 K562 细胞凋亡明显增加,同时 K562 细胞 Fas 表达升高。**结论** 人参总皂甙能诱导 K562 细胞凋亡,其机制可能与调控 Fas 表达升高有关。

关键词:人参总皂甙;K562;凋亡;Fas;FasL

中图法分类号:R282.71; R73-354; R733.7 **文献标识码**:A

Effects of TSPG on apoptosis and expressions of Fas and FasL in K562 cells

CAO Wei-xi[1], WANG Ya-ping[2], LIU Qiong[3], JIANG Rong[2], CHEN Ting-mei[1] ([1]Chongqing Key Laboratory Medical Diagnosis, [2]Department of Histology and Embryology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [3]Chongqing Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To clarify the mechanisms of total saponins of panax ginseng (TSPG) in induction of apoptosis of K562 cells and to provide the theoretical basis and the experimental evidence for its clinical application. **Methods** The effects of TSPG on apoptosis of K562 cells were studied by morphometry, flow cytometry, morphological observation, and immunocytochemistry. **Results** The results indicated that TSPG could markedly inhibit the proliferation of K562 cells and induce the apoptosis of K562 cells. Our experiment also showed that after induction by TSPG, the ratio of positive K562 cells with Fas expression increased. **Conclusion** The mechanisms of TSPG in the induction of K562 cell apoptosis may be related to the increased expression of Fas in K562 cells.

Key words: total saponins of panax ginseng; K562; apoptosis; Fas; FasL

自我国科研工作者报道恶性白血病细胞在砷剂(三氧化二砷)作用下可发生细胞凋亡后,中药及其有效成分诱导白血病细胞凋亡及机制研究已成为血液学领域中极具活力的研究课题之一。但目前选用的诱导凋亡药物多为化学性制剂或毒性中药制剂,具有较大毒性,临床应用副作用较大。如何在治疗中既做到抗癌,又扶正固本已成为摆在我们面前的重大课题。人参是祖国传统医学的"补气"要药,以其攻补兼施、毒副作用小或无、注重整体的优越性已得到广泛认可。人参皂甙是其中的主要药物成分。我们既往研究结果表明:人参皂甙(total saponins of panax ginseng, TSPG)能促进造血干/祖细胞增殖分化及其信号转导、诱导造血生长因子基因表达[1],并能协同 EPO、GM-CSF 诱导 K562 细胞向成熟红系、粒系细胞分化[2]。本研究在既往研究的基础上,探讨 TSPG 诱导人红白血病细胞株 K562 凋亡及其与 Fas 受体相关信号转导的调节,皆在为寻找和开发能诱导白血病细胞凋亡的毒副作用小或无的中药诱导剂——TSPG 提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 人参总皂甙

重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室王亚平教授惠赠,纯度 95%以上,用 RPMI1640 液配成所需浓度。

1.2 K562 细胞

由本校临床生物化学教研室提供,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 液常规传代培养。

1.3 主要药品与试剂

RPMI1640 培养基,美国 GIBCO 公司产品;小牛血清购自杭州四季青公司。

小鼠抗人 Fas、FasL 单克隆抗体由圣地亚哥肿瘤研究所罗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670880)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670880)
作者简介:曹唯希(1963-),女,重庆市人,实验师,主要从事白血病细胞逆转分化和凋亡机制方面的研究。电话:(023)68485030
通讯作者:陈婷梅,电话:(023)68485235,E-mail: chentingmei@sohu.com
收稿日期:2004-09-12;修回日期:2004-10-12

云萍博士惠赠，S-P染色组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

TUNEL检测试剂盒为Roche公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 TSPG对K562细胞的增殖抑制作用 取对数生长期的K562细胞，使细胞终浓度为1×10^5/ml。实验组：培养体系中加入不同浓度的TSPG(50、100、200 μg/ml)；对照组：加等量的RPMI1640液。分别在培养的3,6,9 d取样，进行台盼蓝染色，计数活细胞数。

1.4.2 细胞光镜形态学观察 取各实验组(50、100、200 μg/ml分别作用3、6、9 d)和对照组的细胞离心甩片，瑞氏染色，光镜下观察细胞形态学改变。

1.4.3 细胞周期测定 取对数生长期的K562细胞，使细胞终浓度为1×10^5/ml。实验组：在培养体系中加入终浓度为50、100 μg/ml TSPG；对照组加入等量的RPMI1640液，培养6 d，经流式细胞仪检测，分析得出细胞周期各时相的比例。

1.4.4 电镜超微结构观察 取实验组和对照组的细胞经3%戊二醛固定，1%锇酸后固定经脱水、环氧树脂包埋超薄切片，染色后用H-600透射电镜观察。

1.4.5 TUNEL检测试剂盒观察凋亡细胞 方法按试剂盒说明书进行。同时用图像分析仪随机测量300个细胞，计算凋亡细胞的百分率。

1.4.6 TSPG对K562细胞Fas、FasL表达的影响 取对照组和实验组细胞，PBS洗涤后离心甩片，以小鼠抗人Fas、FasL单克隆抗体(工作浓度分别为1:200、1:100)进行免疫细胞化学S-P法染色，同时设立不加一抗的阴性对照组，图像分析仪计数300个细胞/例，计算表达阳性率。

1.5 统计学处理

用SAS统计软件进行方差分析、秩和检验等。

2 结果

2.1 TSPG对K562细胞的增殖抑制作用

结果显示TSPG对K562细胞的增殖抑制作用与药物的浓度和作用时间有关(图1)。

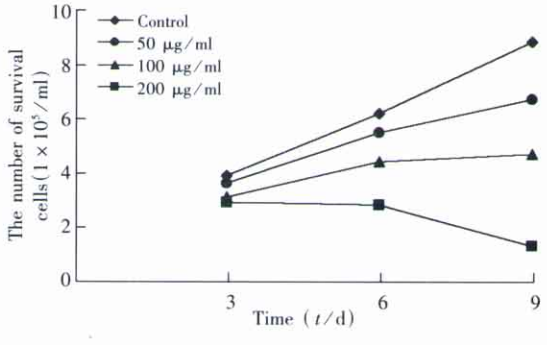


图1 TSPG对K562细胞增殖抑制的影响

Fig 1 Inhibitory effect of TSPG on the proliferation of K562 Cells

2.2 形态学观察

经50、100、200 μg/ml TSPG作用的K562细胞，部分细胞呈现典型的凋亡细胞形态学改变，细胞体积缩小，胞浆凝缩，有的细胞核固缩呈均一致密物，有的细胞核核膜消失，胞核碎裂呈小块或碎片状，但细胞膜完整(图2、3)。电镜下观察凋亡细胞胞浆浓缩，电子密度增加，有的细胞核染色质固缩凝集成块，有的细胞核裂解为碎块。但不同浓度TSPG作用K562细胞达最大凋亡细胞百分率的时间有所不同，50、100 μg/ml TSPG为6 d(其凋亡细胞百分率分别为16.3%、21.5%)。200 μg/ml TSPG为3 d(凋亡细胞百分率为14.1%)。通过形态学观察，我们还发现200 μg/ml TSPG作用K562细胞6 d时可见到细胞体积肿胀增大，细胞浆、细胞核疏松呈网状，出现了细胞坏死现象；200 μg/ml TSPG作用至9 d，坏死细胞百分率达42%。而50、100 μg/ml TSPG在整个观察时期内少见细胞坏死。由此可见，200 μg/ml TSPG作用于K562细胞作用较为强烈，可能多为细胞毒作用。因此我们选择作用较为温和的50、100 μg/ml浓度进行以下实验。

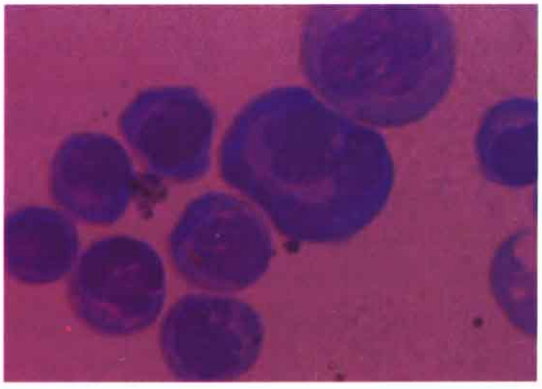


图2 50 μg/ml TSPG (5 d)细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of TSPG (50 μg/ml) on apoptosis of K562 cells at day 5

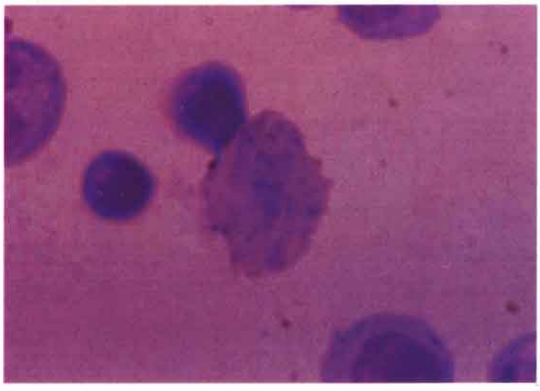


图3 100 μg/ml TSPG (5 d)对K562细胞凋亡的影响

Fig 3 Effect of TSPG (100 μg/ml) on apoptosis of K562 cells at day 5

2.3 TSPG对K562细胞周期的影响

对照组细胞S期占58.55%，G_2 + M期细胞为2.45%，而G_0/G_1细胞39.00%，说明K562细胞处于增殖旺盛状态。K562细胞经TSPG 50 μg/ml作用6 d，细胞周期各时相比例与对照组

无显著性差异，凋亡细胞百分比为 6.35%。而 K562 细胞经 TSPG 100 μg/ml 作用 6 d，S 期占 46.64%，G_2 + M 期细胞为 5.36%，G_0/G_1 细胞为 48.0%，与对照细胞相比有显著性差异，凋亡细胞百分比为 8.16%。表明 100 μg/ml TSPG 作用 K562 细胞 3 d 能将 K562 细胞阻滞在 G_0/G_1 期（表 1），并能诱导部分 K562 细胞呈现 sub-G_1 期的凋亡峰，从而发生凋亡。

表 1　TSPG 对 K562 细胞周期的影响 [$(\bar{x} \pm s)$%]

Tab 1　Effects of TSPG on cell cycle distribution of K562 cells [$(\bar{x} \pm s)$%]

Group	Cell cycle		
	G_0/G_1	S	G_2 + M
Control	39.00 ± 4.63	58.55 ± 6.23	2.45 ± 2.67
TSPG 50 μg/ml	40.92 ± 2.04	56.17 ± 6.88	2.91 ± 4.77
TSPG 100 μg/ml	48.09 ± 4.45*	46.64 ± 7.89*	5.36 ± 2.54

*：$P < 0.05$，*vs* control

2.4　TUNEL 检测试剂盒观察凋亡细胞

经 50 μg/ml，100 μg/ml TSPG 作用 1、3、6 d 的 K562 细胞，TUNEL 检测凋亡细胞阳性率与对照组相比有显著性差异（图 4），但各个检测时间段内结果无明显差异。

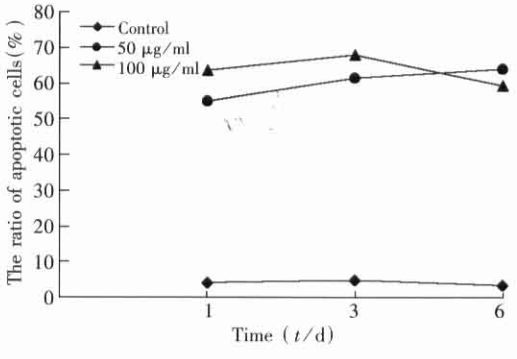


图 4　TSPG 对 K562 细胞凋亡的影响

Fig 4　Effect of TSPG on apoptosis of K562 cells

2.5　TSPG 对 K562 细胞 Fas、FasL 表达的影响

Fas 在对照组 K562 细胞有一定表达，阳性率为 13.93%，而 FasL 表达为 8.65%。50、100 μg/ml TSPG 作用 6 d，K562 细胞的 Fas 表达均升高，与对照组相比有统计学意义；而 FasL 在作用前后则无显著性差异（表 2）。

表 2　TSPG 对 K562 细胞 Fas、FasL 表达的影响 [$(\bar{x} \pm s)$%]

Tab 2　Effects of TSPG on expressions of Fas and FasL of K562 cells [$(\bar{x} \pm s)$%]

Group	Fas	FasL
Control	13.93 ± 2.56	8.65 ± 0.8
TSPG 50 μg/ml	36.26 ± 3.22**	6.74 ± 2.09
TSPG 100 μg/ml	39.03 ± 4.85**	9.11 ± 4.36

**：$P < 0.01$，*vs* control

3　讨论

细胞凋亡是受基因调控的主动的细胞死亡过程，伴随着特征性的形态改变和一系列生化事件。凋亡细胞的主要特征是细胞增殖抑制，流式细胞仪检测出现凋亡细胞特征峰（sub-G_1 峰），细胞胞浆浓缩致密，核染色质凝集，核裂解形成凋亡小体和核 DNA 断裂成 180 ~ 200 bp 的小片段。本研究从形态学、流式细胞仪和 TUNEL 检测来确认细胞凋亡的发生。我们从增殖抑制曲线来看，50、100、200 μg/ml TSPG 均能使 K562 细胞数量明显下降，用流式细胞仪检测也表明：50、100 μg/ml TSPG 均能使 K562 细胞发生凋亡，凋亡细胞百分率分别为 6.35%、8.16%，而且 100 μg/ml TSPG 还能阻止 K562 细胞从 G_0/G_1 期向 G_2/M + S 期移行；从光镜、电镜形态学上观察了 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡的情况，均发现有典型的凋亡细胞，并可见到凋亡小体。此外，本实验采用检测细胞核 DNA 断裂的 TUNEL 法对单个细胞凋亡作原位检测，结果表明：50、100 μg/ml TSPG 均能使 K562 细胞凋亡阳性率增加，且细胞核 DNA 断裂早于形态学改变，也提示细胞凋亡是一有序、有调控的走向死亡过程。

诱导细胞凋亡的信号和转导途径多种多样，其中 Fas-FasL 途径属于死亡因子及其受体介导的信号转导。Fas（CD95）为死亡受体家族成员，是Ⅰ型膜蛋白；当 Fas 与相应配体 FasL（CD95L）结合后，Fas 受体三聚化而活化，激活的受体与 FADD 结合，再与 caspase-8 相互作用使后者激活，最终启动 caspases 家族级联反应而导致细胞凋亡。

Fas 在一些组织中有丰富的表达，有研究资料显示 Fas 几乎可在各种白血病细胞表达[3]，用 Fas 单抗并不能诱导所有 Fas + 细胞凋亡，说明这些白血病细胞可能存在着抗凋亡机制；也有研究表明 Fas 基因转染 HL-60 细胞后，细胞对 rhG-CSF 更敏感，凋亡率更高，从而证实 Fas 是一诱导凋亡基因[4,5]。FasL 则主要分布在激活的 T 细胞、NK 细胞和在免疫赦免区如眼、睾丸中表达[6,7]。新近研究表明 FasL 在一些型别的白血病细胞和身体其它组织上也有表达[8]。

一般认为，白血病细胞表面高水平的功能性 FasL，可能在白血病发病过程中杀死 Fas + 的免疫细胞，从而产生“免疫逃逸”作用[9]；但也有资料显示某些化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡的机制是导致 FasL 表达增加。因此，目前对于 Fas、FasL 在细胞凋亡中的作用有不同的观点。

我们实验发现对照 K562 细胞表面 Fas 阳性率为 13.93%，FasL 阳性率为 8.65%，50、100 μg/ml TSPG 作用后，Fas + 细胞升高，而 FasL 则无明显差异。由此可推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与细胞 Fas 升高有

关。但在我们的体外K562细胞培养体系中，考虑到仍有部分K562细胞FasL阳性，TSPG诱导细胞凋亡到底是Fas+细胞自杀结果？还是相邻细胞膜表面Fas与FasL结合而相互残杀结果？这需要进一步研究。此外，由于Fas和FasL均可从细胞膜上脱落形成可溶形式的sFas、sFasL，当sFas与FasL结合后，抑制相应受体效应(Fas-FasL)从而抑制细胞凋亡作用[8]，而sFasL具有与膜Fas(mFas)同样生物学作用，可引起细胞凋亡。虽然我们实验结果显示mFasL在TSPG作用前后没有变化，但是否有sFasL作用而导致K562细胞凋亡，需要进一步研究和阐明。

参考文献：

[1] 王 勇，王莎莉，王亚平，等. 人参总皂甙对造血生长因子活性及其mRNA表达的影响[J]. 解剖学报，1999，30(4)：362－366.

[2] 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.

[3] Komada Y，Sakurai M. Fas receptor (CD95) -mediated apoptosis in leukemic cells[J]. Leuk Lymphoma，1997，25(1-2)：9－21.

[4] Nagatas S，Golstein P. The Fas death factor[J]. Science，1995，267(5203)：1449－1455.

[5] 宋玉琴，徐功立，张凌岩，等. Fas基因在rhG-CSF诱导白血病细胞凋亡过程中的作用[J]. 中华血液学杂志，1999，20(5)：242－244.

[6] Stuart P M，Griffith T S，Usui N，*et al*. CD95 Ligand (FasL) induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival[J]. J Clin Invest，1997，99(3)：396－402.

[7] Bellgrau D，Gold D，Selawry H，*et al*. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection[J]. Nature，1995，377(6550)：630－632.

[8] 冯晓勤，周淑芸. 急性白血病凋亡因子Fas配基的表达研究[J]. 癌症，2000，19(9)：911－913.

[9] 李爱香，邹 萍，王良利，等. Fas配体在髓系白血病细胞中的表达及功能研究[J]. 中国实验血液学杂志，2002，10(3)：183－186.

(编辑 薛国文)

(上接524页)

多见，最常见的部位是中颅凹(外侧裂)，为65%[1]，男性多于女性。本组中颅凹27例，为75%，男：女为2:1。

IAC在病灶早期，多无明显临床表现，诊断较困难，部分因头部外伤后偶然发现。大多数学者认为颅内压增高是IAC的主要表现之一[1,2]，癫痫发作为另一突出的临床表现。头颅CT或MRI有重要的诊断价值，对IAC位置、大小与脑池、脑室的关系一目了然。CT值的测定，为鉴别颅内囊性占位性病变提供了依据。

IAC一旦确诊，大多数学者认为有明显临床症状则应采取积极的手术治疗[1-3]。对于一些症状轻微或无症状的IAC是否手术？意见尚不一致，有学者认为IAC有自然消失的可能，同时手术并非都有效，手术并发症和术后复发不容忽视[1,2]，但随着时间的推移，囊肿逐渐增大，出现临床症状，并可能影响脑组织的发育，应行手术治疗。因此，对无症状患者需随诊，定期复查CT或MRI和EEG，以防止IAC增大和出血的危险性。有学者认为当今娴熟的手术、麻醉技术和在先进的设备条件下，IAC手术的危险性及并发症已很少，不手术可能脑组织长期受压，囊肿继续增大或并发出血，其危害远超过手术副作用[2,3]。本组随访发现<4岁早期手术的患儿比>4岁术后囊肿缩小或消失快，脑组织发育好。所以我们认为IAC的手术指征如下：①有明显的颅内压增高表现，局部脑组织受压移位；②合并颅内出血；③局灶神经系统定位体征；④有癫痫发作，药物控制无效；⑤<4岁患儿，囊肿>3 cm；⑥无临床症状，但囊肿有增大趋势，EEG和颅内压有变化。

手术治疗常用的方法有：①单纯囊肿切除：囊肿与蛛网膜下腔不相通，仍可能存在压力梯度，影响手术效果，易于复发。②囊腔-腹腔分流术：囊液蛋白含量高或有出血，而易堵塞分流管，且随着患儿生长发育需要更换分流管。③脑立体定向术：适用于脑室内或纵裂内深部较小的囊肿。④神经内窥镜下行囊肿切除+脑池(蛛网膜下腔)交通术：因囊肿具有囊腔，为内镜提供了很好的操作空间，手术创伤小，是神经内窥镜手术极好适应证，但对癫痫病灶的处理困难。⑤显微手术切除囊肿+脑池(蛛网膜下腔)交通术：充分建立囊腔与脑池(蛛网膜下腔)之间的交通，是手术成功，防止复发的关键，并在脑皮层电极的引导下行病灶组织切除或软膜下横纤维切断术。⑥带蒂肌肉填入囊腔：肌肉在囊腔内可发挥强大的吸收作用，并使脏壁两层闭合粘连[3]。本组29例行显微手术切除囊肿+脑池(蛛网膜下腔)交通术，症状明显改善率94%，囊肿缩小或消失率83.3%。参考国内外相关资料，结合我们的临床实践，认为显微手术切除囊肿+脑池(蛛网膜下腔)交通术疗效最好；神经内窥镜下行囊肿切除+脑池(蛛网膜下腔)交通术，因病例数少，尚需进一步探讨；如疗效不佳或囊肿复发后，再行囊腔-腹腔分流术。

关键词：蛛网膜囊肿；诊断；治疗

中图法分类号：R739.41 文献标识码：B

参考文献：

[1] Wester K D. Peculiarities of intracranial arachnoid cysts: location sidedness，and sex distribution in 126 consecutive patients[J]. Neurosurgery，1999，45(4)：775－779.

[2] 吴承远，刘玉光. 临床神经外科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 744－746.

[3] 史学芳，张庆俊，张更思，等. 小儿颅内蛛网膜囊肿32例[J]. 河北医学杂志，2001，17(1)：1－3.

[4] 张玉琪，马振宇. 囊肿-腹腔分流术治疗儿童颅内蛛网膜囊肿[J]. 中华神经外科杂志，2000，16(4)：216－218.

[5] 张俊义，李玉峰. 肌肉填塞治疗颅内蛛网膜囊肿[J]. 中华神经外科杂志，2003，19(2)：155.

(编辑 张大春)