文章编号:1000-5404(2010)07-0621-04

论著

人参皂苷Rg3抑制急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α及VEGF的表达及其机制探讨

王金良,孔佩艳,徐 葳,曾东风 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科)

[摘要] **目的** 探讨人参皂苷Rg3对急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α及VEGF表达的作用及其可能的机制。**方法** 培养正常人及急性白血病患者的骨髓基质细胞,MTT法检测人参皂苷Rg3对正常及急性白血病骨髓基质细胞增殖的抑制作用;RT-PCR检测人参皂苷Rg3处理前后急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α及VEGF mRNA表达的变化;Western blot、免疫荧光检测人参皂苷Rg3处理前后急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK蛋白表达的变化。**结果** 人参皂苷Rg3对骨髓基质细胞增殖抑制的最适作用时间为24 h,最适作用浓度为40 μg/ml;处理24 h后,急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α、VEGF mRNA表达及蛋白表达均明显减少($P<0.05$);p-Akt及p-ERK蛋白表达亦较处理前明显减少($P<0.05$)。**结论** 人参皂苷Rg3可明显抑制急性白血病骨髓基质细胞HIF-1α、VEGF mRNA及蛋白水平的表达,同时可抑制与血管形成密切相关的MAPK、PI3K/Akt途径中Akt、ERK蛋白的磷酸化,提示人参皂苷Rg3可能通过阻断PI3K/Akt、MAPK信号途径抑制急性白血病骨髓的血管生成。

[关键词] 人参皂苷Rg3;急性白血病;骨髓基质细胞;低氧诱导因子-1α;血管内皮生长因子
[中图法分类号] R285.5; R733.7; R730.23 **[文献标志码]** A

Ginsenosisde Rg3 inhibits HIF-1α and VEGF expressions in acute leukemia bone marrow stromal cells

Wang Jinliang, Kong Peiyan, Xu Wei, Zeng Dongfeng (Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of ginsenoside Rg3 on HIF-1α and VEGF expressions in acute leukemia bone marrow stromal cells (BMSCs) and the possible underlying mechanism. Methods BMSCs from normal health individuals and acute leukemia patients were cultivated. The appropriate time and concentration of ginsenoside Rg3 on BMSCs' proliferation were assessed by MTT. The BMSCs were treated with ginsenoside Rg3, and mRNA levels of HIF-1α and VEGF were detected by RT-PCR. In addition, the expression of HIF-1α, VEGF, p-Akt and p-ERK proteins were measured by Western blot analysis and immunofluorescence assays. Results After the addition of ginsenoside Rg3, MTT showed that the appropriate concentration and time was 40 μg/ml and 24 h respectively. HIF-1α and VEGF expressions at mRNA and protein levels were reduced significantly ($P<0.05$). The protein expressions of p-Akt and p-ERK were decreased significantly ($P<0.05$). Conclusion Ginsenoside Rg3 not only significantly inhibits HIF-1α and VEGF mRNA expression but also protein expression in acute leukemia BMSCs. It also down-regulates the phosphorylation of Akt and ERK in PI3K/Akt and MAPK pathways respectively, which are involved in angiogenesis. These results demonstrate an anti-angiogenesis function of ginsenoside Rg3 through PI3K/Akt and MAPK signal pathways in acute leukemia bone marrow.

[Key words] ginsenoside Rg3; acute leukemia; bone marrow stromal cell; hypoxia-inducible factor-1α; vascular endothelial growth factor

Supported by the General Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA(06MB238), the "1520 Talent" Foundation of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University(2006), and the Research Foundation of Chongqing Huasai Pharmaceutical Technology Co., Ltd. Corresponding author: Kong Peiyan, Tel: 86-23-68774209, E-mail: peiyankong@yahoo.com.cn

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB238);第三军医大学新桥医院"1520人才培养工程"基金(2006);重庆华赛医药科技有限公司科研基金
[通信作者] 孔佩艳,电话:(023)68774209,E-mail:peiyankong@yahoo.com.cn

人参皂苷Rg3是从中药人参中提取的单一成分,在非小细胞肺癌治疗的研究中发现其对肿瘤新生血管形成具有明显的抑制作用[1],但对急性白血病的作用

及机制迄今尚少见报道。转录调控因子低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)在急性白血病骨髓基质细胞中的高表达,与白血病骨髓的血管生成有密切的关系[2],但具体作用途径尚有待探讨。本研究拟通过分析人参皂苷 Rg3 对急性白血病骨髓基质细胞 HIF-1α 及 VEGF 表达的影响,以及对血管形成密切相关的 MAPK、PI3K/Akt 途径信号分子 p-ERK、p-Akt 蛋白表达的调节,探讨人参皂苷 Rg3 在急性白血病骨髓血管生成中的作用及可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2009 年 2 -9 月新桥医院初发白血病患者骨髓标本 29 例,年龄 14 ~56 岁,中位年龄 30 岁。其中急性淋巴细胞白血病 13 例(男性 8 例,女性 5 例),急性髓细胞白血病 16 例(男性 9 例,女性 7 例)。正常骨髓标本 18 例(男性 10 例,女性 8 例),年龄 15 ~60 岁,中位年龄 32 岁。经均衡性检验,3 组年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要试剂

人参皂苷 Rg3:重庆华赛医药有限公司惠赠,纯度 95% 以上,DMSO 助溶后与含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液配成 800 mg/L 的工作液(DMSO 终浓度不超过 0.1%,可不做溶剂对照),正压过滤除菌。RPMI1640 培养基、胎牛血清(HyClone 公司),小鼠抗人 HIF-1α 单克隆抗体、小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、标记 CY3 的山羊抗小鼠荧光二抗、标记 FITC 的山羊抗小鼠及抗兔荧光二抗(Santa Cruz 公司),兔抗人 t-Akt 多克隆抗体、兔抗人 p-Akt(Ser473)多克隆抗体、兔抗人 t-ERK 多克隆抗体、小鼠抗人 p-ERK(Thr202/Tyr204)单克隆抗体(Cell signaling 公司),山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司)。

1.3 方法

1.3.1 骨髓基质细胞的培养 培养方法参见文献[3],细胞汇合度达 80% 左右提取总蛋白和总 RNA;消化细胞进行细胞爬片,进行 MTT 及免疫荧光的检测。

1.3.2 MTT 法测定人参皂甙 Rg3 的最佳作用浓度和时间 实验设药物处理组、细胞对照组和空白对照组。空白对照组只加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液,取生长良好的原代骨髓基质细胞制成 1×10^4/ml 单细胞悬液接种 96 孔培养板,每孔 200 μl(即 2×10^3/孔),37 ℃、5% CO_2 培养箱培养,12 h 后细胞已贴壁,细胞对照组加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液,药物处理组加入终浓度分别为 20、40、60、80、100 mg/L 的人参皂甙 Rg3,各浓度设 3 个复孔,继续培养 6、12、24、48 h,实验中止前加入 10% MTT 溶液(10 mg/ml)10 μl,继续孵育 4 h,除去各孔培养液,加 DMSO 100 μl,用酶联仪测定在波长 490 nm 处各孔光密度值[D(490)]。按下列公式计算。

增殖抑制率 = {1 -[药物处理组 D(490)值 - 空白对照组 D(490)值]/[细胞对照组 D(490)值 - 空白对照组 D(490)值]} ×100%。

1.3.3 RT-PCR 检测骨髓基质细胞 HIF-1α 及 VEGF mRNA 的表达 实验设正常对照组、正常 Rg3 组、急性髓细胞白血病(AML)组、AML Rg3 组、急性淋巴细胞白血病(ALL)组、ALL Rg3 组。采用 Trizol 一步法提取原代培养的骨髓基质细胞总 RNA,以 Beckman coulter Du800 仪测定总 RNA 的 D(260)/D(280) 值和 RNA 浓度,反转录获得 cDNA,并以之为模版进行 PCR 扩增。PCR 引物序列及扩增条件分别为:内参照 β-actin 上游引物:5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′,下游引物:5′-GATCTTGATCTTCATGGTGGTAGG-3′,退火温度 60 ℃,循环 28 次,产物长度 650 bp;HIF-1α 上游引物:5′-TCCATGGTAC-CATGAGGAAA-3′,下游引物:5′-ACCAAGCAGGTCATAGGTGG-3′,退火温度 55 ℃,循环 28 次,产物长度 252 bp;VEGF 上游引物:5′-GAGCGGAGCCGCGAGAAGTG-3′,下游引物:5′-TCCAT-GAGCCCGGCTTCCGA-3′,退火温度 55 ℃,循环 28 次,产物长度 131 bp。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果采用凝胶成像系统进行分析。

1.3.4 Western blot 检测骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF 、p-Akt、p-ERK 蛋白的表达 分组同 RT-PCR。提取细胞总蛋白进行含量检测,常规法进行 Western blot 检测,HIF-1α 抗体 1∶200,VEGF 抗体 1∶500,p-Akt 抗体、t-Akt 抗体、p-ERK 抗体、t-ERK 抗体均为 1∶1 000、β-actin 抗体 1∶2 000,二抗 1∶1 000,ECL 显影。

1.3.5 免疫荧光检测骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 蛋白的表达 常规方法进行检测,设 Rg3 处理组、Rg3 未处理组,24 h 后取出爬片。一抗浓度均为 1∶100,标记 Cy3 及 FITC 的二抗浓度分别为 1∶200、1∶100,荧光显微镜观察。荧光定量分析软件 IPP 5.1 分析蛋白表达量。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,2 组间的比较用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 细胞培养

骨髓基质细胞生长良好,主要呈梭形,间或有三角形等(图 1)。取生长良好的原代骨髓基质细胞进行 MTT、RT-PCR、Western blot 和免疫荧光检测。

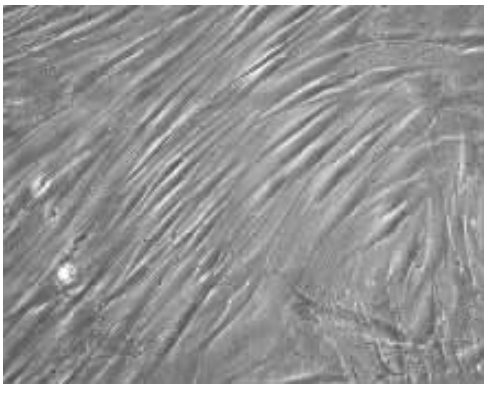


图 1 倒置相差显微镜观察原代培养的骨髓基质细胞 (×200)

2.2 MTT 法检测人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞增殖的抑制作用

人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞具有明显的抑制作用,而且这种作用具有时间和剂量依赖性。作用 6、12 h 细胞的抑制率变化没有明显差异;而在作用 24 h 后,细胞生长速度减慢,增殖力

明显降低，其 IC_{50} 值为 40 mg/L。作用 48 h 后，骨髓基质细胞出现明显变形及碎片。本实验检测人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞作用的最适药物浓度和作用时间分别为 40 mg/L 和 24 h。见图 2。

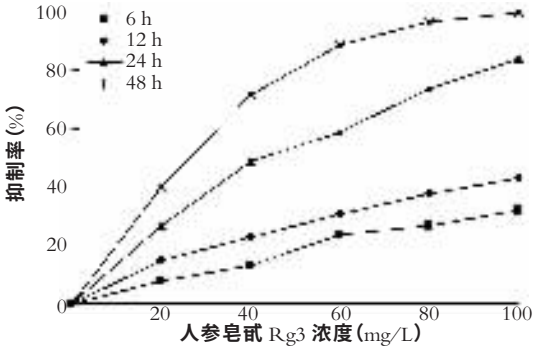
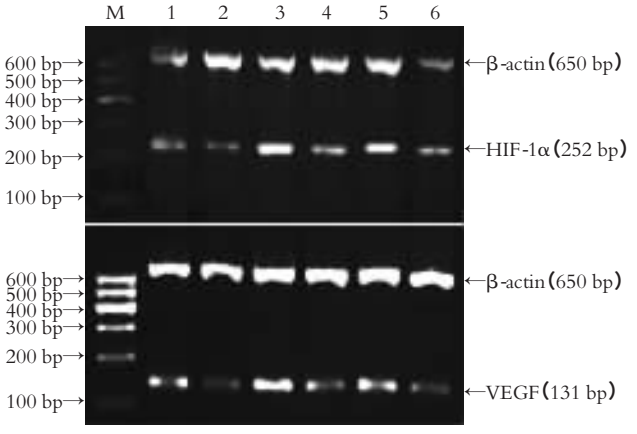


图 2　不同浓度人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞的抑制作用

2.3　RT-PCR 检测人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF mRNA 表达的影响

AML 组、ALL 组 HIF-1α、VEGF mRNA 表达明显高于正常对照组（$P<0.05$）。人参皂甙 Rg3 明显降低了各组 HIF-1α、VEGF mRNA 的表达水平（$P<0.05$）。电泳结果见图 3，半定量结果见表 1。



M：标准；1：正常对照组；2：正常 Rg3 组；3：AML 组；4：AML Rg3 组；5：ALL 组；6：ALL Rg3 组

图 3　RT-PCR 检测人参皂甙 Rg3 对 HIF-1α、VEGF mRNA 表达的影响

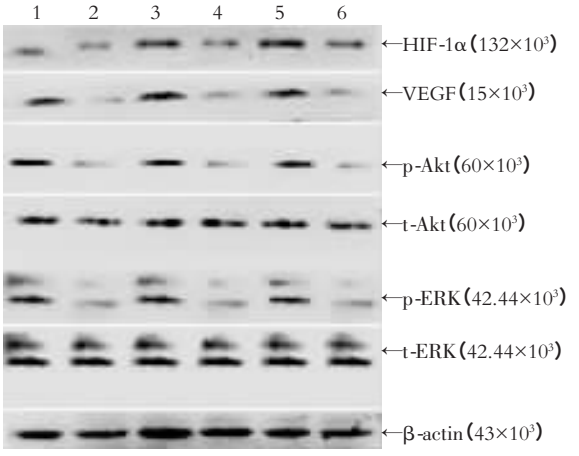
表 1　人参皂甙 Rg3 对 HIF-1α、VEGF mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	HIF-1α	VEGF
正常对照组	0.61 ± 0.02	0.43 ± 0.05
正常 Rg3 组	0.34 ± 0.03[a]	0.15 ± 0.02[a]
AML 组	0.84 ± 0.05[a]	0.90 ± 0.04[a]
AML Rg3 组	0.52 ± 0.03[b]	0.54 ± 0.03[b]
ALL 组	0.89 ± 0.06[a]	0.79 ± 0.05[a]
ALL Rg3 组	0.60 ± 0.05[c]	0.33 ± 0.04[c]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 AML 组比较；c：$P<0.05$，与 ALL 组比较

2.4　Western blot 检测人参皂甙 Rg3 对骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 蛋白表达的影响

AML 组、ALL 组 HIF-1α、VEGF 蛋白表达明显高于正常对照组（$P<0.05$），3 组间 p-Akt、p-ERK 蛋白表达差异无统计学意义（$P>0.05$）。人参皂甙 Rg3 明显降低了各组 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 的表达水平（$P<0.05$）。电泳结果见图 4。



1：正常对照组；2：正常 Rg3 组；3：AML 组；4：AML Rg3 组；5：ALL 组；6：ALL Rg3 组

图 4　Rg3 对 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 蛋白表达的影响

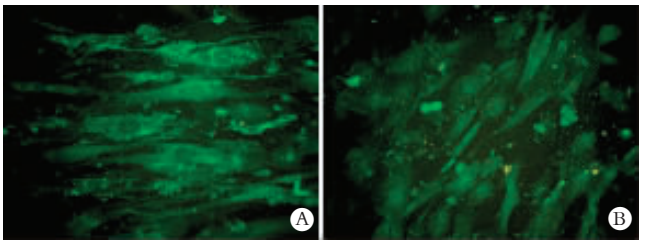
2.5　人参皂甙 Rg3 对急性白血病骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 蛋白表达的影响

人参皂甙 Rg3 处理急性白血病骨髓基质细胞后，免疫荧光检测 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 蛋白的表达水平较未处理组明显降低（$P<0.05$）。HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 的表达分别见图 5～8，荧光定量分析软件 IPP 5.1 分析结果见表 2。

表 2　人参皂甙 Rg3 对急性白血病骨髓基质细胞 HIF-1α、VEGF、p-Akt、p-ERK 表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

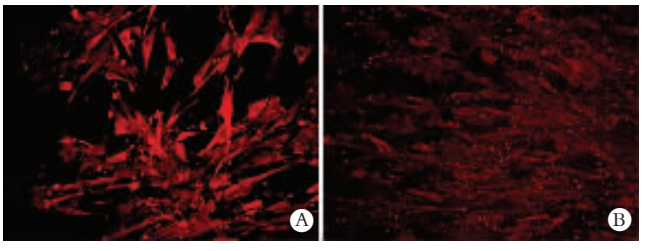
组别	HIF-1α	VEGF	p-Akt	p-ERK
Rg3 未处理组	201.67 ± 14.26	194.59 ± 13.21	312.32 ± 20.17	198.43 ± 15.16
Rg3 处理组	121.90 ± 12.01[a]	98.61 ± 8.46[a]	180.50 ± 14.38[a]	110.28 ± 11.37[a]

a：$P<0.05$，与 Rg3 未处理组比较



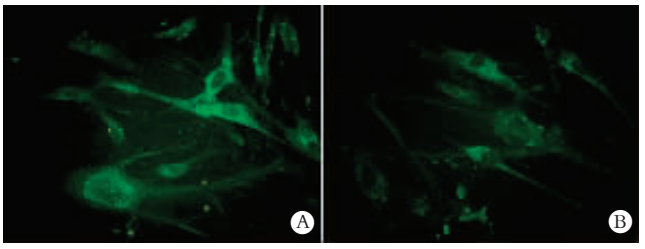
A：人参皂甙 Rg3 未处理组　HIF-1α 主要于细胞质表达，呈明显阳性；B：人参皂甙 Rg3 处理组　HIF-1α 蛋白表达明显减弱

图 5　免疫荧光检测人参皂甙 Rg3 对 HIF-1α 在急性白血病骨髓基质细胞中的影响　（×200）



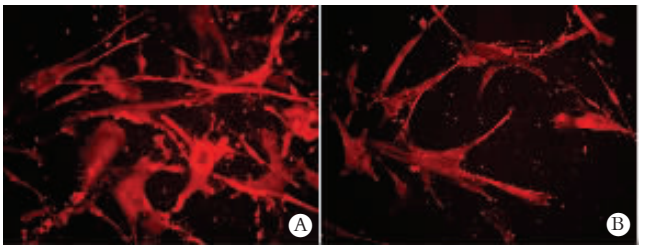
A：人参皂甙 Rg3 未处理组　VEGF 于细胞质表达，呈明显阳性；B：人参皂甙 Rg3 处理组　VEGF 蛋白表达明显减弱

图 6　免疫荧光检测人参皂甙 Rg3 对 VEGF 在急性白血病骨髓基质细胞中表达的影响　（×200）



A:人参皂甙 Rg3 未处理组 p-Akt 于细胞质表达,呈明显阳性;
B:人参皂甙 Rg3 处理组 p-Akt 蛋白表达明显减弱

图7 免疫荧光检测人参皂甙 Rg3 对 p-Akt 在急性白血病骨髓基质细胞中表达的影响 (×200)



A:人参皂甙 Rg3 未处理组 p-ERK 于细胞质表达,呈明显阳性;
B:人参皂甙 Rg3 处理组 p-ERK 蛋白表达明显减弱

图8 免疫荧光检测人参皂甙 Rg3 对 p-ERK 在急性白血病骨髓基质细胞中表达的影响 (×200)

3 讨论

血管生成是肿瘤无限制增殖、侵袭性生长及转移的关键。血管生成有赖于血管生成促进因子和抑制因子之间的动态平衡。随着肿瘤细胞生长和增殖,低氧环境的形成、生长因子的异常分泌以及癌基因的异常表达等均可以增加血管生成促进因子的表达及减少血管生成抑制因子表达,从而强烈地刺激新生血管生成。目前已知最关键的血管生成促进因子是 VEGF。人参皂甙 Rg3 是一种近年来应用于临床的抗肿瘤血管生成的药物。对多种实体肿瘤的研究表明,人参皂甙 Rg3 具有明显的抗血管生成作用[4,5],但其作用机制尚待进一步研究,且对白血病骨髓血管形成的影响也尚少见研究报道。

骨髓造血微环境异常是白血病发生、发展的重要原因,白血病患者的骨髓造血微环境存在多种形态和功能的异常,包括微血管的密度明显增加、某些与新生血管相关的生长因子如 VEGF 的表达增高、趋化因子如基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及转录调控因子 HIF-1α 的表达增高等[6,7]。HIF-1α 可通过调控下游多种血管生成调控因子,如 VEGF、SDF-1 等,促进血管生成[8]。本研究发现,人参皂甙 Rg3 明显抑制了 HIF-1α 和 VEGF 在急性白血病骨髓基质细胞中 mRNA 和蛋白的表达,因此推测人参皂甙 Rg3 可能通过抑制 HIF-1α、VEGF 的表达而发挥抗白血病骨髓血管生成的作用。

PI3K/Akt 和 MAPK 信号途径是调控 HIF-1α 的两条重要途径,其中 MAPK 途径具有细胞特异性[8]。研究表明,低氧能够通过 MAPK 和 PI3K 途径诱导胃癌上皮黏膜细胞 HIF-1α 上调,从而诱导 VEGF 的表达[9];Bcl-2 也能通过 MAPK 和 PI3K 途径诱导上调黑色素瘤细胞的 HIF-1α 和 VEGF 的表达,从而促进血管生成[10];化学物质冈田酸(okadaic acid)可通过 Akt 途径激活 HIF-1 从而上调 VEGF 的表达,促进新生血管生成[11]。本研究发现,人参皂甙 Rg3 降低了 ERK 和 Akt 的磷酸化水平,从而在一定程度上阻断了 MAPK 和 PI3K/Akt 两条信号途径,这表明在人参皂甙 Rg3 抑制白血病骨髓血管生成的过程中,不仅 HIF-1α、VEGF 表达下降,PI3K/Akt 和 MAPK 途径也发挥了重要作用。

综上所述,人参皂苷 Rg3 可能通过抑制 HIF-1α 和 VEGF 的表达发挥在白血病骨髓造血微环境中的抗血管生成作用,而 PI3K/Akt 和 MAPK 两条信号途径可能均参与了抗血管生成的调控。PI3K/Akt 和 MAPK 途径可分别被特异性抑制剂 LY294002 和 U0126 阻断,我们将对比人参皂甙 Rg3 和抑制剂的作用结果以进一步证实其抗血管生成作用。

参考文献:

[1] 孙燕, 林洪生, 朱允中, 等. 长春瑞滨合并顺铂(NP)加参一胶囊或安慰剂治疗晚期非小细胞肺癌的多中心双盲随机临床研究报告[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(3): 254-258.

[2] 陈震章, 欧阳建, 张启国, 等. 急性白血病骨髓组织中低氧诱导因子-1α 表达与血管生成关系的研究[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(8): 725-727.

[3] 曾东风, 孔佩艳, 陈幸华, 等. 缺氧诱导因子-1α 和 PTEN、P53 在急性髓性白血病骨髓基质细胞中的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(3): 316-318, 326.

[4] Yue P Y, Wong D Y, Wu P K, *et al*. The angiosuppressive effects of 20(R)- ginsenoside Rg3[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(4): 437-445.

[5] Xu T M, Xin Y, Cui M H, *et al*. Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(7): 584-588.

[6] Mirshahi P, Toprak S K, Faussat A M, *et al*. Malignant hematopoietic cells induce an increased expression of VEGFR-1 and VEGFR-3 on bone marrow endothelial cells via AKT and mTOR signalling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(3): 1003-1010.

[7] Dommange F, Cartron G, Espanel C, *et al*. CXCL12 polymorphism and malignant cell dissemination/tissue infiltration in acute myeloid leukemia[J]. FASEB J, 2006, 20(11): 1913-1915.

[8] Semenza G L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24: 97-106.

[9] Liu L, Ning X, Han S, *et al*. Hypoxia induced HIF-1 accumulation and VEGF expression in gastric epithelial mucosa cell: involvement of ERK1/2 and PI3K/Akt[J]. Mol Biol (Mosk), 2008, 42(3): 459-469.

[10] Trisciuoglio D, Iervolino A, Zupi G, *et al*. Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(9): 4153-4162.

[11] Kim Y S, Ahn K H, Kim S Y, *et al*. Okadaic acid promotes angiogenesis *via* activation of hypoxia-inducible factor-1[J]. Cancer Lett, 2009, 276(1): 102-108.

(**收稿**: 2009-10-30;**修回**: 2009-11-20)
(编辑 张 维)