文章编号:1000-5404(2014)21-2167-06

论著

人参总皂苷 TSPG 联合 EPO 对白血病细胞 KG1-α 增殖的影响

李丹阳,夏 菁,冯子强,石庆强,游智梅,刘泽洪,陈地龙,李 静 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,干细胞与组织工程研究室)

[摘要] **目的** 探讨人参总皂苷 TSPG 单独或联合人促红细胞生成素(EPO)对人白血病细胞 KG1-α 增殖的影响及机制探讨。**方法** 体外培养 KG1-α 细胞,选取处于对数生长期的细胞用于实验。空白对照组予以常规培养;人参总皂苷 TSPG 组分别加入 25、50、100、200、400 mg/L TSPG;人参总皂苷 + EPO 组加入上述等量 TSPG,同时加入 0.5 U/L EPO,并设置 EPO 对照组。培养 3、7、14 d 后用 CCK-8 法检测 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞增殖的影响;运用 Real-time PCR 技术检测 EPOR、STAT5、Jak2、AKT 等 EPO/EPOR 通路相关基因的表达。用 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3、P53、P16 等蛋白的表达,EPOR 蛋白的表达及其活性。**结果** 人参总皂苷 TSPG 在体外能明显抑制 KG1-α 细胞的增殖,100 μmol/L 为最适作用浓度,7 d 为最适作用时间,如果在 EPO 存在的条件下,其最适浓度则降低到 75 mg/L;与对照组相比,在 EPO 存在的条件下人参总皂苷 TSPG 诱导可明显使细胞阻滞于 G_0/G_1 期,若不使用 EPO 则 TSPG 对细胞周期无影响;Real-time PCR 检测结果显示 TSPG 诱导组 KG1-α 细胞内 EPOR、Jak2、STAT5 等由 EPOR 介导的 JAK-STAT 通路相关基因的表达均随 TSPG 浓度增加而降低,其中高浓度具有明显差异($P<0.05$);Western blot 检测经单独使用 TSPG 处理了 7 d 的 KG1-α 细胞,与对照组相比,其 EPOR 及 p-EPOR 表达明显下调,Jak2、STAT5、p-STAT5、Bcl-2 蛋白表达下调,而 Bax、Cleaved Caspase-3 表达增高,P53 及 P16 无变化;然而添加了 EPO 处理的各组 p-EPOR、Jak2、p-STAT5、P53 及 P16 的表达明显增加,Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 的表达没有变化。**结论** TSPG 能下调细胞内由 EPOR 介导的 Jak-STAT 通路相关蛋白的表达,并降低 EPOR 的活性,进而下调 Bcl-2、上调 Bax 和 Cleaved Caspase-3 来促进细胞凋亡;而添加了 EPO 后这种作用被拮抗,抑制细胞增殖的作用是通过上调 P53 及 P16 促进细胞衰老而产生的。

[关键词] 人参总皂苷;KG1-α 细胞;促红细胞生成素;细胞凋亡;细胞衰老
[中图法分类号] R285.5; R73-361; R733.7 [文献标志码] A

Effect of total saponins of panax ginseng combined with erythropoietin on proliferation in leukemia KG1-α cells

Li Danyang, Xia Jing, Feng Ziqiang, Shi Qingqiang, You Zhimei, Liu Zehong, Chen Dilong, Li Jing (Department of Histology and Embryology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of total saponins of panax ginseng (TSPG) separately or jointly with erythropoietin (EPO) on the proliferation of human leukemia cell line KG1-α and investigate the possible underlying mechanism. **Methods** The KG1-α cells were respectively treated by 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L TSPG in presence or absence of 0.5 U/L EPO. The cells cultured in normal condition served as control. CCK-8 assay was utilized to detect the proliferation of KG1-α cells in 3, 7 and 14 d after treatment. Real-time PCR was employed to detect the mRNA expression of EPO/ EPO receptor (EPOR) pathway related genes, such as EPOR, STAT5, Jak2, and AKT. Western blot analysis was used to measure the expression of apoptosis related proteins, Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3, P53, P16 and EPOR. **Results** TSPG significantly inhibited the proliferation in KG1-α cells, with 100 μmol/L as optimal concentration and 7 d as best treatment period. In the presence of 0.5 U/L EPO, its optimal concentration was decreased to 75 mg/L. Compared with the control, TSPG significantly arrested the cell cycle at G_0/G_1 phase in the presence of EPO, but without the EPO, TSPG had no effect on cell cycle. Real-time PCR analysis showed that the expression of

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171929,31271368);重庆市教委科学技术研究项目(KJ110328)
[通信作者] 李 静,电话:(023)68485614,E-mail:lijingjj@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0846.012.html(2014-09-18)

the genes related to EPOR-mediated Jak-STAT signaling pathway, such as EPOR, Jak2 and STAT5 genes were in a negatively dose-dependent manner with TSPG in KG1-α cells, especially in the cells treated by high dose TSPG ($P<0.05$). Western blotting indicated that the expression of EPOR, p-EPOR, Jak2, STAT5, p-STAT5 and Bcl-2 was down-regulated, while that of Bax and Cleaved Caspase-3 proteins was increased, and that of P53 and P16 had no change in the KG1-α cells treated by TSPG in absence of EPO. However in the presence of EPO, the expression of p-EPOR, Jak2, p-STAT5, P53 and P16 was significantly increased, while Bcl-2, Bax and Cleaved Caspase-3 had no change in expression. **Conclusion** TSPG down-regulates the expression of EPOR and related proteins in Jak-STAT pathway mediated by EPOR, decreases the activity of EPOR, then reduces the expression of Bcl-2 protein, and increases the expression of Bax and Cleaved Caspase-3 proteins to promote the cell apoptosis in the KG1-α cells. While, when combining EPO, these effects are antagonized. The inhibition of cell proliferation is induced by increasing the expression of P53 and P16 and promoting cell senescence.

[**Key words**] total saponins of panax ginseng; KG1-α cells; apoptosis; erythropoietin; senescence

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171929, 31271368) and the Project of Chongqing Municipal Commission of Education (KJ110328). Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68485614, E-mail: lijingjj@gmail.com

人参皂苷(ginsenosides)是人参化学成分中最重要的有效成分,可以对机体的代谢、免疫系统、内分泌系统以及抗氧化应激系统产生重要作用,表现出很强的药理作用[1-3]。人参总皂苷是人参中多种皂苷类成分的总和,近年的研究表明人参总皂苷既能促进造血干/祖血细胞增殖分化,又能抑制非正常细胞如人白血病细胞的增殖,表现出中药的适应源性。EPO是促红细胞生成素(erythropoietin)的英文简称,是一种糖蛋白激素,能够促进红细胞生成。近年来有研究表明,EPO是一种抗凋亡因子[4],介导多种细胞抗凋亡的作用,从而发挥器官的保护作用。Schuster等[5]报道EPO调节红细胞生成的一种主要机制就是防止红系祖细胞凋亡。同时在多种肿瘤细胞的表面有EPOR表达,使EPO/EPOR信号通路在肿瘤尤其是血液肿瘤治疗研究中有着非常重要的作用。本实验拟联合或者单独使用TSPG和EPO,观察二者对白血病细胞KG1-α的增殖抑制、诱导分化及细胞周期的影响;从基因、蛋白表达及活性等方面检查细胞中EPO/EPOR信号通路、Bcl-2/Bax/Caspase凋亡信号通路、细胞衰老等相关基因蛋白的表达,初步研究TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞作用机制,对临床同时运用人参总皂苷和EPO治疗白血病及贫血时,药物之间相辅相成作用及拮抗作用起到一定指导作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

人白血病细胞KG1-α为本实验室冻存保留。以5×10^8/L接种于含10%胎牛血清的RPMI1640培养液中,在37 ℃、5% CO_2饱和湿度下常规培养,每隔2 d传代换液。

1.2 主要试剂及仪器

人参总皂苷TSPG购自中国药品生物制品检定所(纯度≥90%);RPMI1640培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;rhEPO(5 000 U/mL)购自美国RD公司;CCK8试剂购自日本同仁化学研究所;总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司;逆转录试剂及PCR试剂购自Promega公司;鼠抗人EPOR单克隆抗体购自Abcam公司;兔抗人p-EPOR、Phospho-Jak2单克隆抗体购自ABGENT公司;兔抗人Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3、STAT5、p-STAT5、Jak2、P53、P16购自Epitomics公司;ECL发光试剂盒购自Millipore公司;细胞培养箱购自美国Forma scientific公司;4800型PCR扩增仪购自美国Bio-Rad公司。

1.3 TSPG的配制

以少量RPMI1640溶解TSPG配制成浓度为2 g/L的储存液,-20 ℃保存。实验前以含10%胎牛血清的RPMI1640稀释至所需浓度。

1.4 CCK-8实验检测联合或者单独使用TSPG和EPO对KG1-α细胞增殖的影响

采用对数生长期的KG1-α细胞,调整密度为5×10^5/mL,分为4组:空白对照组、TSPG组、EPO对照组、EPO+TSPG组。其中空白对照组予以常规培养;TSPG组分别加入25、50、75、100、150、200 mg/L TSPG;EPO对照组加入0.5 U/L EPO(临床用药治疗贫血的常规剂量);EPO+TSPG组加入0.5 U/L EPO,然后分别加入25、50、75、100、150、200 mg/L TSPG,各组细胞以200 μL的培养体系接种于96孔板,每个浓度设置6个复孔,分别培养3、7、14 d后,每孔加入10 μL CCK-8反应液后,于37 ℃、5% CO_2培养3 h,然后用酶标仪(波长450 nm)测定各孔光密度值[$D(570)$],按如下公式计算细胞生长抑制率(IR),实验重复3次。抑制率=[对照组$D(570)$-实验组$D(570)$]/对照组$D(570)\times100\%$。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

选择对数生长期的KG1-α细胞,接种于6孔板中,使细胞

终浓度为 1×10^5/mL。空白对照组:常规培养;TSPG 组:加入 TSPG(终浓度为 100、200 mg/L);EPO 对照组加入 0.5 U/L EPO;EPO + TSPG 组加入 0.5 U/L EPO,然后分别加入 50、75 mg/L TSPG。培养 3 d 后,各孔转入 30 mL 培养瓶中,继续培养,并于第 7 天收集细胞,用 0.02 mL PBS(pH = 7.4)洗涤细胞 2 次,70% 冷乙醇固定,4 ℃存放过夜。测定前去除固定液,加入 RNA 酶工作液和碘化丙啶,4 ℃染色处理 30 min,300 目滤网过滤后流式细胞仪检测,分析得出细胞周期各时相比例。

1.6 Real-time PCR 检测联合或者单独使用 TSPG 和 EPO 前后 KG1-α 细胞 EPOR、Bcl-2 mRNA 表达

Trizol 法提取各组细胞总 RNA,RT-PCR 逆转录获得 cDNA。Real-time PCR 检测 KG1-α 细胞中 EPOR、Jak2、STAT5、AKT、PI3K、JNK mRNA 表达。PCR 反应步骤:Real-time 反应采用 25 μL 体系:模板 2 μL,上下引物各取 0.1 μL,SYBR 荧光酶 12.5 μL,DEPC 水 10.8 μL。循环条件为:99.5 ℃ 30 s 预变性,95 ℃ 5 s、58 ℃ 15 s、72 ℃ 15 s,共 40 个循环。

1.7 Western blot 检测 TSPG 和 EPO 处理前后 KG1-α 细胞的 EPO/EPOR 通路相关蛋白的表达

收集空白对照组、TSPG 组(终浓度 0.05、0.075 g/mL)、EPO 对照组、EPO + TSPG 组(终浓度 0.05、0.075 g/mL)诱导 7 d 的 KG1-α 细胞,细胞裂解液提取蛋白并 BCA 法检测其浓度,调整浓度时各组均为 4 μg/μL,加入 SDS 凝胶上样缓冲液开水煮沸 4 min 变性后恒压电泳(浓缩胶 70 V、分离胶 100 V),后 250 mA 横流电转,将蛋白转入 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4 ℃摇床过夜,TBST 洗一抗 4 × 15 min,二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗二抗 4 × 15 min,ECL 发光液显示荧光,X 线胶片曝光显示条带,计算各泳道灰度值,对比内参蛋白 β-actin,统计各组相应蛋白的表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 人参总皂苷 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞增殖的影响

不同浓度的 TSPG(单独或联合 EPO)作用于白血病细胞株 KG1-α 细胞 3、7、14 d 后,CCK8 法检测结果如表 1 所示,实验组较对照组细胞增殖活性明显降低,其中单独使用 TSPG 对 KG1-α 细胞增殖抑制作用在 3 d 时不是很明显,7 d 时有明显的剂量依赖和时间依赖关系,其中 200 mg/L 为 IC_{50}浓度,而 14 d 实验条件不易把握,同时稍高剂量(200 mg/L)即出现细胞毒性。单独使用 EPO 后对细胞有一定的促进增殖作用(7 d 较明显),但其达到 IC_{50}所需的 TSPG 浓度较低(约为 75 mg/L)。

2.2 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞周期的影响

对照组与各实验组 KG1-α 细胞周期的分布结果见表 2 和图 1。G_0/G_1期细胞数量比例:TSPG 组与空白对照组相比,差异没有统计学意义($P>0.05$);而 TSPG + EPO 组与 EPO 对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);且与 TSPG 组相比,TSPG + EPO 处理组增多,差异有统计学意义($P<0.05$);与空白对照组相比,其他各组 S 期细胞数量比例变化不显著($P>0.05$),但与体外培养 7 d 后 75 mg/L TSPG + EPO 组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);各组间的 G_2/M 期细胞分布差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组 KG1-α 细胞周期百分比(%,$n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照组	35.08 ± 2.13	57.35 ± 1.33	7.57 ± 0.12
TSPG(100 mg/L)组	36.49 ± 3.19	55.51 ± 4.52	8.00 ± 0.26
TSPG(200 mg/L)组	37.00 ± 2.26	55.70 ± 3.75	7.30 ± 0.46
EPO 对照组	32.10 ± 1.52	55.03 ± 5.55	12.87 ± 1.10
TSPG(50 mg/L) +0.5 U/L EPO 组	38.8 ± 2.44[ab]	51.05 ± 4.69	10.10 ± 0.49
TSPG(75 mg/L) +0.5 U/L EPO 组	41.7 ± 4.23[ab]	49.86 ± 3.55[c]	8.41 ± 1.00

a:$P<0.05$,与 EPO 对照组比较;b:$P<0.05$,与 TSPG(100、200 mg/L)组比较;c:$P<0.05$,与空白对照组比较

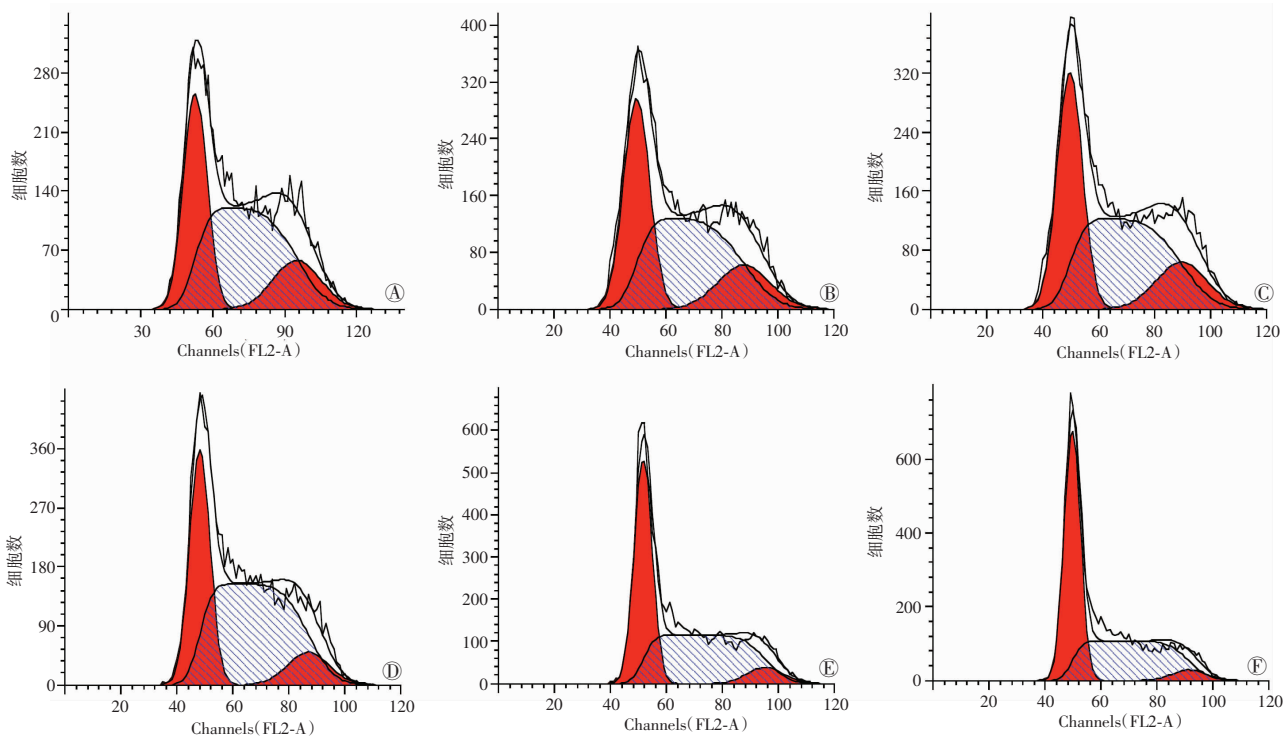
2.3 Real-time PCR 检测 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞 EPO/EPOR 信号通路 mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果显示(图 2),单独使用 TSPG 7 d 后,KG1-α 细胞内 EPOR、Jak2、STAT5 等 EPO/EPOR 通路相关基因表达均随 TSPG 浓度增加而降低,其中高浓度具有明显差异($P<0.05$),但 PI3K、AKT、JNK 这几个基因的表达无明显变化,这表明 TSPG 能从基因水平抑制由 EPOR 介导的 Jak-STAT 途径,对 PI3K/AKT 通路则无影响。然而,仅添加了 EPO 之后,EPO 组较空白对照组各基因表达均有所增加,但无统计学差异,说明单独使用 EPO 对 EPO/EPOR 通路相关基因的表达无影响;而在同时使用 EPO 和 TSPG 之后,各基因的表达水平较空白对照组无变化或差异不明显($P>0.05$)。这表明 EPO 能抑制或者拮抗 TSPG 对 EPOR 介导的 Jak-STAT 途径相关基因表达下调的作用。

表 1 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞增殖的抑制作用($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

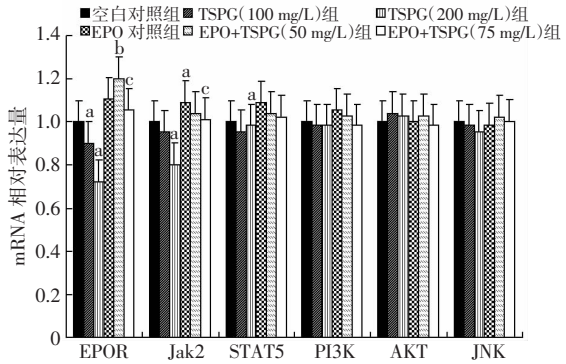
组别	D(570)值			抑制率(%)		
	3 d	7 d	14 d	3 d	7 d	14 d
空白对照组	1.01 ± 0.11	1.43 ± 0.15	2.04 ± 0.12	—	—	—
TSPG(100 mg/L)组	1.03 ± 0.13	1.20 ± 0.04[a]	1.47 ± 0.14[a]	—	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.02
TSPG(200 mg/L)组	0.88 ± 0.11	0.97 ± 0.04[a]	1.00 ± 0.02[a]	0.13 ± 0.01	0.29 ± 0.04	0.50 ± 0.05
EPO 对照组	1.15 ± 0.14	1.56 ± 0.21	2.21 ± 0.24	—	—	—
TSPG(50 mg/L) +0.5 U/L EPO 组	1.20 ± 0.08	1.31 ± 0.17[a]	1.69 ± 0.22[a]	—	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.03
TSPG(75 mg/L) +0.5 U/L EPO 组	1.05 ± 0.04	1.06 ± 0.08[a]	0.90 ± 0.04[a]	0.09 ± 0.01	0.31 ± 0.04	0.55 ± 0.05

a:$P<0.05$,与空白对照组比较



A:空白对照组;B:TSPG(100 mg/L)组;C:TSPG(200 mg/L)组;D:EPO对照组;E:TSPG(50 mg/L)+EPO组;F:TSPG(75 mg/L)+EPO组

图1 TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞周期的影响



a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与TSPG(100 mg/L)组比较;c:$P<0.05$,与TSPG(200 mg/L)组比较

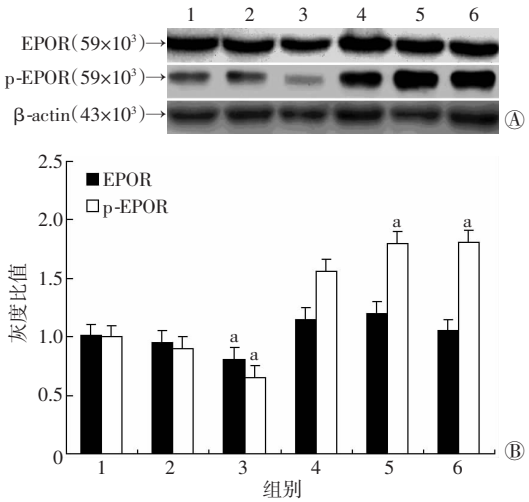
图2 Real-time PCR检测TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞株EPO/EPOR信号通路mRNA表达的影响

2.4 Western blot检测TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞全细胞蛋白中EPOR含量的表达及活性的影响

结果如图3所示:经过单独使用TSPG处理了7 d的KG1-α细胞,与空白对照组相比,其EPOR及其磷酸化表达明显下调($P<0.05$);而添加了EPO处理的EPOR表达较空白对照组无明显差异,但p-EPOR表达则明显增加($P<0.05$),并且TSPG 75 mg/L+EPO组p-EPOR表达明显高于单独使用EPO组。

2.5 Western blot检测TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞全细胞蛋白中EPOR通路主要相关蛋白含量的影响

Western blot结果如图4显示:经过单独使用TSPG处理了7 d的KG1-α细胞,与空白对照组相比,其Jak2、STAT5及其磷酸化表达下调,以200 mg/L明显($P<0.05$);然而添加了EPO处理的各组没有这种下调的趋势,反而有上调的趋势。



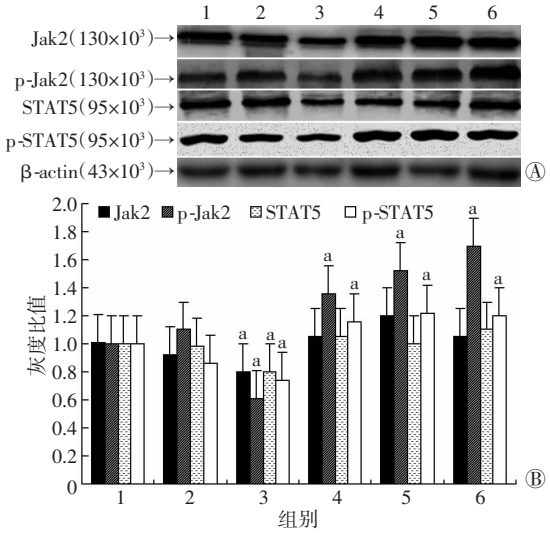
A:Western blot结果;B:半定量分析;1:空白对照组;2:TSPG(100 mg/L)组;3:TSPG(200 mg/L)组;4:EPO对照组;5:TSPG(50 mg/L)+0.5 U/L EPO组;6:TSPG(75 mg/L)+0.5 U/L EPO组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图3 TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞全细胞蛋白中EPOR表达及活性的影响

2.6 Western blot检测TSPG单独或联合EPO对KG1-α细胞全细胞蛋白中细胞凋亡相关蛋白表达的影响

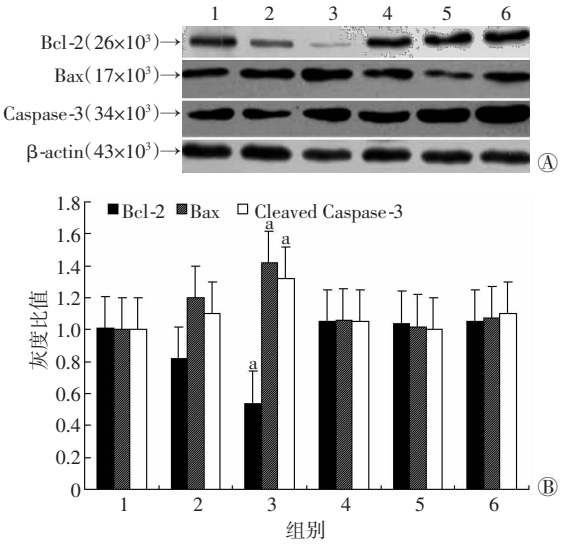
Western blot结果如图5所示,经不同浓度TSPG诱导7 d后KG1-α细胞Bcl-2蛋白表达下调,而Bax蛋白表达上调,同时

Cleaved Caspase-3 表达增高($P<0.05$),表明其促凋亡功能被增强;然而添加了 EPO 的各组中,Bcl-2、Bax 较空白对照组无变化,Cleaved Caspase-3 蛋白表达上调。



A: Western blot 结果;B:半定量分析;1:空白对照组;2:TSPG(100 mg/L)组;3:TSPG(200 mg/L)组;4:EPO 对照组;5:TSPG(50 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;6:TSPG(75 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 4 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞中 Jak2、STAT5 及其磷酸化表达的影响

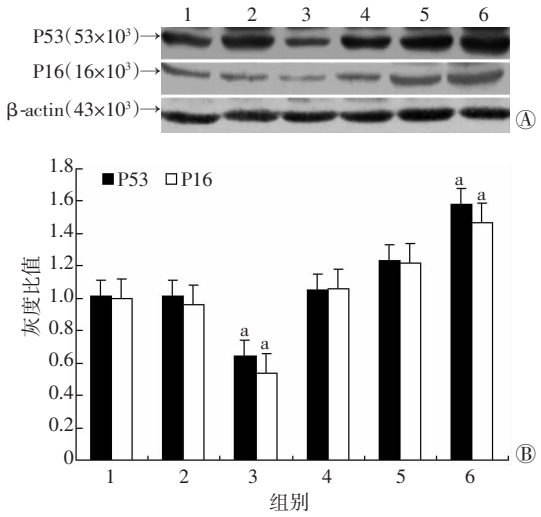


A: Western blot 结果;B:半定量分析;1:空白对照组;2:TSPG(100 mg/L)组;3:TSPG(200 mg/L)组;4:EPO 对照组;5:TSPG(50 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;6:TSPG(75 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 5 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞中 Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 表达的影响

2.7 Western blot 检测 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞全细胞蛋白中细胞衰老相关蛋白表达的影响

Western blot 结果如图 6 所示,经不同浓度 TSPG 诱导 7 d 后 KG1-α 细胞衰老相关蛋白表达不变或下调,然而添加了 EPO 的各组中空白对照组表达增强($P<0.05$),表明添加了 EPO 的各组 TSPG 能通过上调 P53、P16 等蛋白使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期并诱导细胞衰老。



A: Western blot 结果;B:半定量分析;1:空白对照组;2:TSPG(100 mg/L)组;3:TSPG(200 mg/L)组;4:EPO 对照组;5:TSPG(50 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;6:TSPG(75 mg/L)+0.5 U/L EPO 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 6 TSPG 单独或联合 EPO 对 KG1-α 细胞全细胞蛋白中 P53、P16 蛋白表达的影响

3 讨论

人参是中国传统医药的补气要药,既往研究表明,人参有效成分对白血病细胞具有增殖抑制的作用[6-7],人参总皂苷能够抑制白血病细胞 KG1-α 的增殖,并诱导其向红系分化[8];同时 TSPG 能对 EPO 依赖性(TF-1/EPO)和 EPO 非依赖性(K562)的红系白血病细胞均有显著的增殖抑制作用并诱导其分化。

促红细胞生成素最早用于治疗终末期肾病和贫血的患者,因为这些患者自身分泌 EPO 的水平降低[9]。这些治疗均成功地增加红细胞数和血红蛋白和血细胞比容水平,从而减少患者的输血需求量和减少红细胞输血次数[10]。EPO 也用于治疗患者与癌症相关的贫血。促红细胞生成素也参与调节血管生成[11],肿瘤血管生成[12],以及在肿瘤细胞的存活和生长[13-14]中的作用。于是出现了一个问题,EPO 在治疗肿瘤引起的贫血时是否会促进肿瘤的生长?在治疗白血病的同时使用 EPO 治疗贫血是否弊大于利是本实验的研究重点。

通过 CCK-8 实验表明,在作用 7 d 后,单独使用 TSPG 或者联合 EPO,均能使 KG1-α 细胞的增殖受到抑制,并呈剂量和时间依赖性。有意义的是,在联合使用 EPO 时,达到相同的抑制率所需要的 TSPG 的量要明显低于单独使用 TSPG 的各组(TSPG 组 IC_{50} 为 188.4 mg/L,TSPG + EPO 组 IC_{50} 为 73.2 mg/L)。通过 RT-PCR、Western blot 等实验结果,我们推测:单独使

用TSPG后,能够使细胞膜表面的EPOR活性下降,进而抑制其下游的Jak2、STAT5等信号蛋白的活性,Alas等[15]研究发现活化的STAT5进入胞核后通过刺激Bcl-2和Bcl-xL抗凋亡基因转录,产生大量Bcl-2和Bcl-xL抗凋亡蛋白。提示TSPG可有效地促进KG1-α细胞凋亡,可能是通过上调Bax和Cleaved Caspase-3蛋白,增加其促凋亡功能,并减弱Bcl-2蛋白的抗凋亡活性来发挥作用。与此相对,添加了EPO之后,细胞表面的EPOR活性上调,其下游的Jak2、STAT5等信号蛋白的活性也上调;另外,内源性EPO还可通过STAT5下调促凋亡蛋白基因如Bax和Caspase-3等基因的表达,来发挥抗凋亡作用。由此提示TSPG产生的促进细胞凋亡的作用可能被EPO所拮抗。

那么TSPG联合EPO是如何引起细胞的增殖抑制的?通过对细胞周期的检测发现单独使用TSPG对细胞周期无影响,联合使用EPO后,可以使G_0/G_1期细胞数量明显增加。细胞周期是指细胞的增殖分化的一个动态平衡的过程,可以把细胞分为G_0/G_1期、S期、G_2期和M期,细胞周期调控发生紊乱,是恶性肿瘤增殖迅速的一个重要原因。有研究表明[16],衰老细胞内主要含有的是G_0/G_1期的DNA,因此衰老细胞停滞于G_0/G_1期,不能进入S期。同时,激活P16、P53等都与G_0/G_1期停滞有关,这表明细胞周期G_0/G_1期的关卡是衰老的关键调控点。在P16和P53缺失的癌组织中,未能检测到细胞衰老,但在癌前病变或非致死性肿瘤中可以检测到细胞衰老[17]。Collado等[18]在小鼠模型中发现在癌前病变和腺瘤中可以检测到衰老细胞以及一些衰老特异标志基因,但在腺癌细胞中不能检测到衰老细胞,提示激活的癌基因在小鼠体内诱发细胞衰老。诱导肿瘤细胞发生衰老已成为抗肿瘤研究中的另一个新策略[19]。Western blot检测细胞衰老相关蛋白P53、P16等表达,发现TSPG(75 mg/kg)+EPO组衰老相关蛋白表达明显上调,衰老细胞明显增加。我们推测:TSPG联合EPO作用于白血病细胞后,能够激活P53,激活的P53能上调P16,从而阻止细胞由G_0/G_1期向S期转变,进一步影响DNA的复制和修复,发生衰老样的周期阻滞,产生生长抑制。但这种表现与TSPG联合EPO后对EPO/EPOR通路的激活作用是否相关仍待下一步研究。

综上所述,TSPG能够通过促进细胞凋亡途径来引起非EPO依赖性生长的白血病细胞KG1-α细胞增殖抑制,虽然这种促进凋亡的作用会被EPO所拮抗,但添加EPO后能通过影响细胞周期来使KG1-α细胞增殖抑制,那么对于EPO依赖性生长的白血病细胞如TF-1、UT-7等细胞株是否有相同的作用,是本课题进一步研究的重点,由此可以指导在不同类型的白血病临床治疗过程中对于TSPG和EPO的使用方法。

参考文献:

[1] 赵保胜, 刘洋, 徐暾海. 人参皂苷Rg1对人胃癌BGC-823的抑制作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(4): 361-365.

[2] 曲惠青, 刁汇玲, 张慧, 等. 人参皂甙Rg1对人慢性粒细胞白血病p210 bcr/abl融合蛋白表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(10): 1851-1853.

[3] Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(Suppl 1): S37-S44.

[4] Koury M J, Bondurant M C. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells[J]. Science, 1990, 248(4953): 378-381.

[5] Schuster S J, Koury S T, Bohrer M, *et al*. Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats[J]. Br J Haematol, 1992, 81(2): 153-159.

[6] 陈地龙, 刘永刚, 王亚平, 等. 人参多糖对K562细胞增殖抑制及诱导分化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 517-520.

[7] 王金良, 孔佩艳, 徐葳, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 621-624.

[8] 刘晓岩, 李静, 王建伟, 等. 人参总皂甙对白血病细胞KG1α增殖、凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2599-2603.

[9] Hedley B D, Allan A L, Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(20): 6373-6380.

[10] Kertesz N, Wu J, Chen T H, *et al*. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis[J]. Dev Biol, 2004, 276(1): 101-110.

[11] Christopherson K W 2nd, Hangoc G, Broxmeyer H E. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase Ⅳ regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells[J]. J Immunol, 2002, 169(12): 7000-7008.

[12] Christopherson K W 2nd, Hangoc G, Mantel CR, *et al*. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26[J]. Science, 2004, 305(5686): 1000-1003.

[13] Dev A, Byrne S M, Verma R, *et al*. Erythropoietin-directed erythropoiesis depends upon serpin inhibition of erythroblast lysosomal cathepsins[J]. J Exp Med, 2013, 210(2): 225-232.

[14] Hand C C, Brines M. Promises and pitfalls in erythopoietin-mediated tissue protection: are nonerythropoietic derivatives a way forward?[J]. J Investig Med, 2011, 59(7): 1073-1082.

[15] Alas S, Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs[J]. Cancer Res, 2001, 61(13): 5137-5144.

[16] 胡作为, 周燕萍, 沈自尹. p16基因与细胞衰老关系的研究进展[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2004, 27(4): 200-202.

[17] Chen Z, Trotman L C, Shaffer D, *et al*. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis[J]. Nature, 2005, 436(7051): 725-730.

[18] Collado M, Gil J, Efeyan A, *et al*. Tumour biology: senescence in premalignant tumors[J]. Nature, 2005, 436(7051): 642.

[19] Phatak P, Burger A M. Telomerase and its potential for therapeutic intervention[J]. Br J Pharmacol, 2007, 152(7): 1003-1011.

(**收稿**:2014-04-24;**修回**:2014-06-27)

(编辑 吴培红)