维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0001-05

当归多糖对 K562 细胞增殖抑制及定向红系细胞分化的实验研究

宋姝丹,王建伟,王亚平,姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究当归多糖(Angelica polysaccharide,APS)对人红白血病细胞株(K562)增殖抑制及定向红系细胞分化的影响。方法:采用细胞体外培养技术、MTT 法、台盼蓝拒染法与流式细胞术检测 APS 对 K562 细胞增殖的影响。光镜观察细胞形态变化;联苯胺染色与分光光度法检测经 APS 诱导后 K562 细胞向红系分化的特征和血红蛋白含量的变化。结果:APS 对 K562 细胞的增殖有明显的抑制作用,抑制强度与 APS 的剂量和作用时间密切相关;经 APS 诱导后 K562 细胞的联苯胺染色阳性率增高,合成血红蛋白的量提高。结论:APS 在体外对 K562 细胞有明显的增殖抑制及诱导其向红系细胞分化的作用。

【关键词】当归多糖;K562;抑制;分化;红系细胞

【中国图书分类法分类号】R932 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-25

Experimental study on the effect of angelica polysaccharide on inhibition of proliferation and induced differentiation towards erythroid cell of human erythroleukemia cell line(K562)

SONG Shu-dan, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Angelica polysaccharide on inhibition of proliferation and induced erythrocytic differentiation of human erythroleukemia cell line(K562). *Methods*: Techniques of cell culture were used in this experiment. The effect of APS on proliferation of K562 was examined by MTT、trypan blue staining and flow cytometry. The change of cell form was observed by Wright's stain. The effect of APS induced erythrocytic differentiation of K562 was detected by cytochemistry and spectrophotometric method. *Results*: APS can significantly inhibit the proliferation of K562 ex vivo, and the inhibitory extent is paralleled to the concentration and the acting time of APS; APS promoted the expression of Hb. *Conclusion*: APS can significantly inhibit the proliferation and induce the differentiation towards erythroid cell of K562 ex vivo.

【Key words】 APS; K562; Inhibition of proliferation; Differentiation; Erythroid cell

当归是祖国传统医学的"补血"要药,当归多糖(Angelia polysaccharide,APS)是其主要有效成分之一[1]。近年来,本课题组较为系统地研究了 APS 对造血系统和白血病细胞的作用,提示 APS 具有双向调控作用,有可能成为既能促进正常造血,又能抑制白血病细胞增殖并诱导其向成熟方向分化的天然抗肿瘤药物[2-4]。本项研究以人红白血病细胞株(K562)为对象,进一步探讨 APS 对其增殖与诱导分化为红系细胞的影响,旨在为 APS 的临床用药和药物开发提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 APS

重庆医科大学化学教研室分离提取(纯度 >90%),以 RPMI 1640 培养液配制成所需浓度,过滤除菌。

1.2 K562 细胞

本校基础医学研究所惠赠,在含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液中常规培养,每 48~72h 换液传代。

1.3 主要药品与试剂

RPMI 1640 培养基(美国 GIBGO 公司),小牛血清(杭州

作者介绍:宋姝丹(1981-),女,硕士,
主要研究方向:造血调控的分子机制。
通讯作者:王亚平,男,教授,E-mail:ypwang@public.cta.cq.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572429)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

四季清公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),其它试剂由本实验室常规配制。

1.4 细胞增殖影响的检测

取对数生长的 K562 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,加入 APS 终浓度为 100~1 000mg/L,对照组加入等量培养液,分别在培养第 2、4、6d 取样,进行台盼蓝染色,计数活细胞数。在培养至 1、2、3、4、5、6d 时,在 96 孔板中加入 MTT,测定不同浓度 APS 作用 K562 细胞的吸光值 A(测定波长 570nm)。计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(IR)=(A 对照组 -A 药物组)/A 对照组 × 100%。

1.5 细胞周期测定

取对数生长的 K562 细胞,APS 组加入终浓度为 200 mg/L 的 APS,对照组加入等量培养液,培养第 3、6d 取样,用 0.02mol/L PBS(pH7.2)洗涤,70%冰乙醇固定,4℃存放。测定前去除固定液,加入 RNA 酶工作液和碘化丙啶,4℃染色 30min,过 300 目滤网后上流式细胞仪(Becton-Dickinson,FACS Calibur),每例标本测定 3×10^4 个细胞,经计算机处理分析得出细胞周期各时相比例。

1.6 细胞形态学观察

取对照组、经 200mg/L 及 1 000mg/L APS 诱导的 K562 细胞,离心涂片,Wright's 染色,光镜下观察细胞形态。

1.7 联苯胺染色检测

取对照组和经 200mg/L APS 诱导组细胞进行联苯胺染色,随机计数 200 个细胞,计算阳性率。

1.8 血红蛋白含量的测定[5]

取培养第 1、2、3d 的对照组及终浓度为 100~500mg/L 的 APS 作用的 K562 细胞 1×10^7 个,加入 1ml 裂解液(0.12% Tris,0.8%NaCl,0.03%乙酸镁,0.5%NP-40)充分混匀,冰上孵育 15min,4℃、1 500r/min,离心 15min,取上清液在紫外 - 可见光分光光度仪(Backman,Du530)上检测不同 APS 浓度作用不同时间的吸光值 A(波长为 414nm)。根据 A414 等于 1.0 时溶液中的血红蛋白浓度为 0.13mg/ml,计算细胞平均血红蛋白含量。

1.9 统计学分析

所获数据采用 SAS8.2 进行方差分析。

2 结 果

2.1 APS 对 K562 细胞的增殖抑制作用

台盼蓝拒染法(表 1)和 MTT 法(表 2)结果显示:随加入 APS 剂量增高,作用时间延长,对 K562 细胞的抑制作用提高。提示 APS 在体外对 K562 细胞有明确的增殖抑制作用。

2.2 APS 对 K562 细胞增殖周期的影响

对照组 K562 细胞第 3d 检测结果显示:S 期细

表 1 APS 对 K562 细胞的增殖抑制作用(台盼蓝拒染法)

APS 的浓度 (mg/L)	n	不同时间的活细胞数 ($\times10^5$ 个/ml)			
		0d	2d	4d	6d
0	3	1	2.30 ± 0.46	5.17 ± 0.87	10.27 ± 0.86
100	3	1	2.20 ± 0.62	4.83 ± 0.80	9.23 ± 0.67
200	3	1	1.97 ± 0.50	4.46 ± 0.85	7.40 ± 1.71*
300	3	1	1.67 ± 0.45	3.73 ± 0.70	5.93 ± 0.99*
500	3	1	1.47 ± 0.45	3.27 ± 0.45*	4.87 ± 0.68*
1000	3	1	1.27 ± 0.38	2.20 ± 0.46*	2.67 ± 0.59*

*$P<0.05$ 与 0 mg/L APS 对照相比较

表 2 APS 对 K562 细胞的增殖抑制作用(MTT 法)

APS 的浓度 (mg/L)	n	抑制率(%)					
		1d	2d	3d	4d	5d	6d
0	3	0	0	0	0	0	0
100	3	13.33 ± 3.21*	15.67 ± 2.08*	17.67 ± 2.08*	22.33 ± 3.21*	26.00 ± 2.00*	29.33 ± 2.08*
200	3	16.67 ± 1.53*	21.00 ± 2.65*	26.00 ± 2.00*	27.00 ± 3.00*	29.67 ± 2.08*	35.00 ± 2.00*
300	3	21.33 ± 1.53*	25.33 ± 2.52*	28.67 ± 2.08*	31.00 ± 1.73*	33.67 ± 2.08*	35.33 ± 2.52*
500	3	32.00 ± 2.65*	36.00 ± 3.46*	40.33 ± 2.52*	38.67 ± 1.53*	44.67 ± 2.52*	48.33 ± 1.53*
1000	3	41.33 ± 2.52*	49.00 ± 5.29*	51.33 ± 4.04*	51.33 ± 1.15*	56.33 ± 1.53*	58.00 ± 4.00*

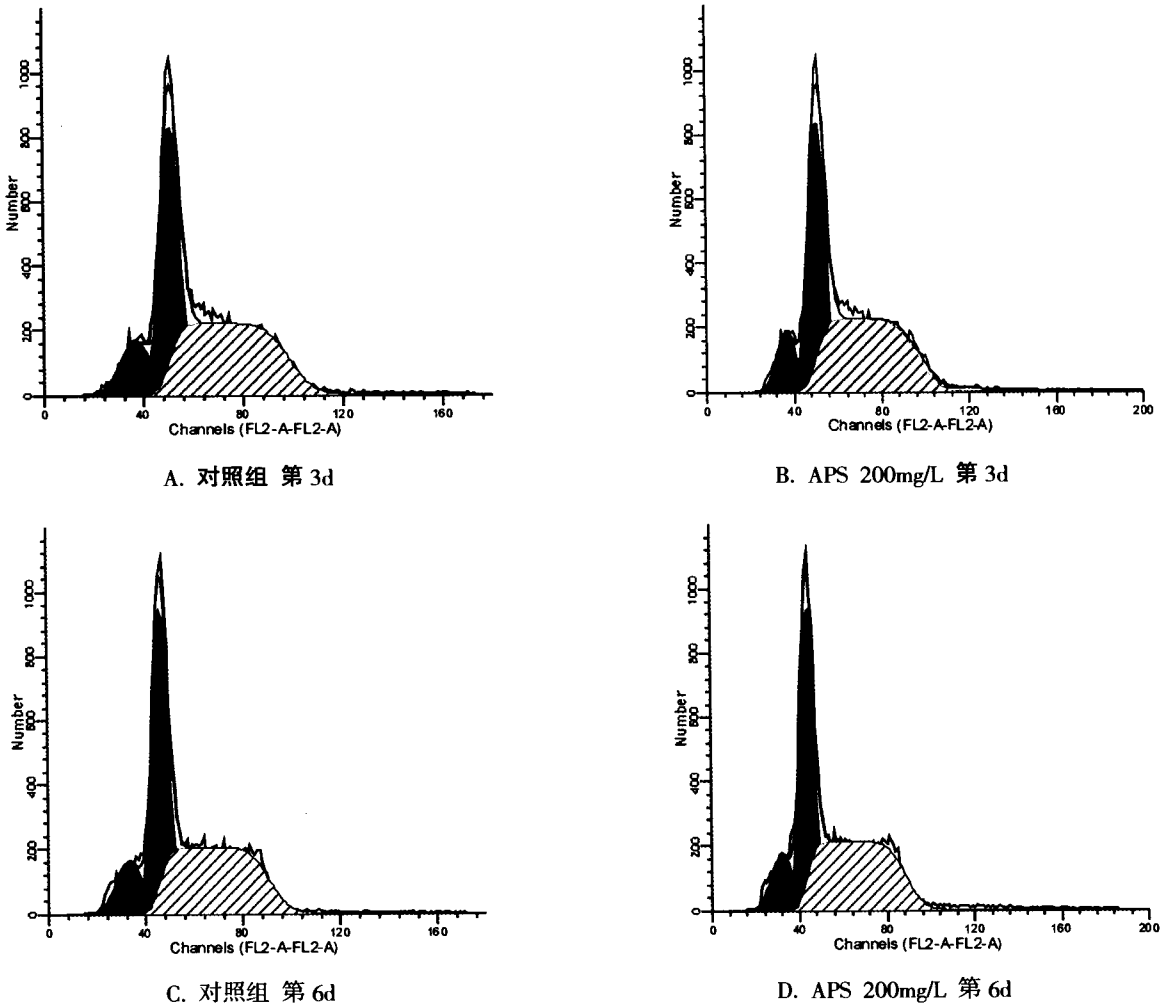
*$P<0.05$ 与 0mg/L APS 对照相比较 细胞增殖抑制率(IR)=(A 对照组 -A 药物组)/A 对照组 × 100%

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 流式细胞仪分析 APS 对 K562 细胞增殖周期的影响

处理条件	n	细胞周期(%)		
		G_0/G_1	S	G_2+M
对照组 3d	3	44.41 ± 4.65	53.79 ± 6.32	1.80 ± 0.80
APS 200 mg/L 3d	3	48.41 ± 5.56	49.27 ± 6.24	2.32 ± 1.41
对照组 6d	3	48.91 ± 6.45	47.00 ± 7.89	4.09 ± 2.52
APS 200 mg/L 6d	3	62.94 ± 8.30*	34.73 ± 5.76*	2.33 ± 1.34

*$P<0.05$ 与对照组比较



A. 对照组 第 3d　　B. APS 200mg/L 第 3d

C. 对照组 第 6d　　D. APS 200mg/L 第 6d

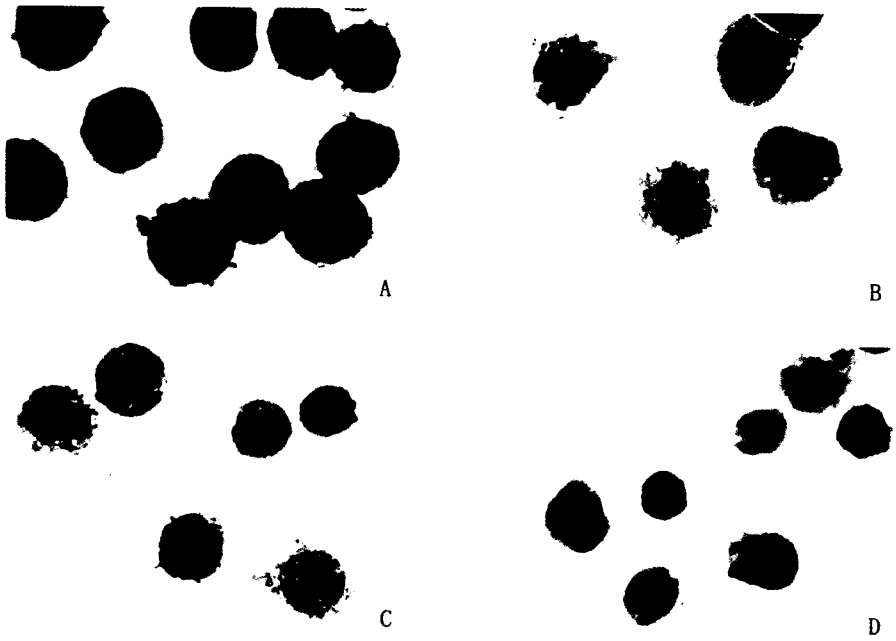
图 1 流式细胞仪分析 APS 对 K562 细胞增殖周期的影响

胞占 56.91%，经 APS 200mg/L 作用的 K562 细胞，第 3d 处于 S 期的细胞有所减少，G_1 期细胞增多；第 6d 时对照组的 K562 细胞 G_0/G_1 期细胞占 48.41%，而 APS 作用组处于 S/G_2+M 期的 K562 细胞数明显减少，G_0/G_1 期细胞增多。提示 APS 能阻止 K562 细胞由 G_0/G_1 期向 S/G_2+M 期移行（图 1，表 3）。

2.3 APS 诱导 K562 细胞的形态学变化

对照组 K562 细胞体积较大，核大而明显，核仁清楚，核浆比例大，胞浆强嗜碱性，无特殊颗粒。APS 1 000mg/L 作用 K562 细胞第 2d 即表现出细胞毒作用，大部分细胞可见胞核固缩，核裂，胞浆中可见大量空泡，胞膜不完整，甚至细胞崩解。APS 200mg/L 诱导 K562 细胞第 3d，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，胞浆量丰富，核浆比例降低；作用第 6d 细胞变化更加明显（图 2）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A.对照组 K562 细胞(Wright's stain × 1 000);B.APS 1 000mg/L 诱导 K562 细胞第 2 d(Wright's stain × 1 000);C.APS 200mg/L 诱导 K562 细胞第 3 d(Wright's stain × 1 000);D.APS 200mg/L 诱导 K562 细胞第 6 d(Wright's stain × 1 000)。

图 2 APS 诱导 K562 细胞的形态学变化

表 4 APS 诱导 K562 细胞的联苯胺染色反应

处理条件	*n*	联苯胺染色阳性细胞率(%)		
		1d	3d	6d
对照组	5	1.20 ± 0.97	8.00 ± 0.94	10.10 ± 1.29
APS200 mg/L	5	7.20 ± 2.59*	20.00 ± 3.22*	46.30 ± 4.55*

*$P<0.05$ 与对照组比较

表 5 APS 诱导 K562 细胞血红蛋白合成

APS 的浓度 (mg/L)	*n*	A		
		1d	2d	3d
0	3	0.450 ± 0.034	0.573 ± 0.052	0.548 ± 0.081
100	3	0.636 ± 0.091	0.645 ± 0.072	0.710 ± 0.136
200	3	0.798 ± 0.089	0.822 ± 0.141	0.888 ± 0.038
300	3	0.923 ± 0.198*	0.981 ± 0.222	1.105 ± 0.295*
500	3	1.081 ± 0.287*	1.257 ± 0.281*	1.392 ± 0.332*

*$P<0.05$ 与 0mg/L APS 对照

2.4 APS 诱导 K562 向红系分化的细胞化学改变

经 200mg/L APS 作用后,K562 细胞的联苯胺染色反应阳性率明显提高(表 4,图 3)。

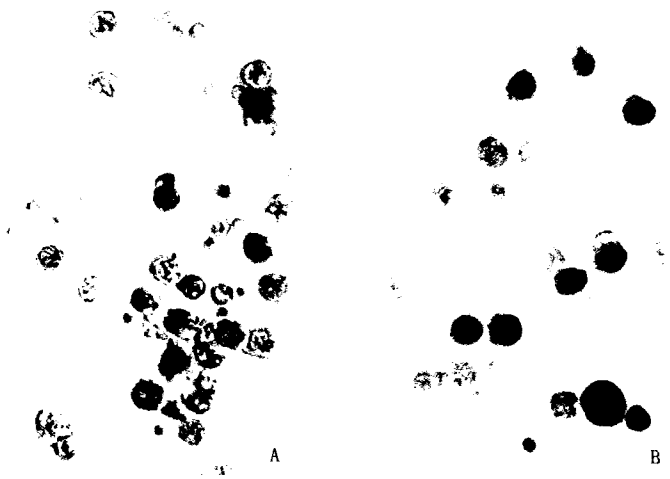
2.5 APS 诱导 K562 细胞血红蛋白合成

APS 诱导 K562 细胞血红蛋白合成与 APS 的浓度有关,500mg/L APS 诱导 K562 细胞第 1~3 d 均引起血红蛋白的合成明显增加(表 5)。

3 讨 论

既往研究证明:APS 是当归中"补血活血"或促进血细胞发生的有效成分,能刺激造血干 / 祖细胞的增殖与分化,促进贫血动物外周血细胞恢复。但 APS 能否影响白血病细胞的增殖分化报道甚少,近

维普资讯 http://www.cqvip.com



A. 0mg/L APS 作用第 3 d(联苯胺染色 × 400);B. 200mg/L APS 作用第 3 d(联苯胺染色 × 400)

图 3 联苯胺染色观察 APS 诱导 K562 细胞的红系分化

年来大量文献报道,中药多糖能抑制肿瘤细胞增殖并诱导其向成熟方向分化,是很有研究和开发价值的天然抗肿瘤药物[6]。本研究在我们既往工作基础上探讨 APS 对人红白血病细胞的影响,旨在为 APS 的临床用药提供理论与实验依据。

白血病细胞的生物学特点是细胞增殖失控,分化成熟受阻,正常的凋亡程序失调,导致异常分化细胞大量增殖。因此治疗白血病的有效方法就是抑制细胞增殖,诱导异常分化的细胞向成熟方向分化。K562 细胞是人红白血病细胞株,具有向红系、粒系和巨核系细胞分化的特点,是研究诱导分化的理想细胞模型。

研究结果表明:APS 对 K562 细胞的增殖有显著的抑制作用,且随着培养体系中加入的药物剂量的增加和作用时间的延长对细胞增殖的抑制效应提高。流式细胞术检测发现经 APS 作用后处于细胞周期中静止期(G_0/G_1 期)的 K562 细胞数量增加,而增殖活跃期的细胞数量减少,提示 APS 可以通过作用 K562 细胞的细胞周期达到增殖抑制作用。形态学观察发现 1 000mg/L APS 作用 K562 细胞第 2 d,大量的 K562 细胞破碎,表现出细胞毒作用。另有文献报道 APS 对人粒细胞白血病细胞株 KG1、单核细胞白血病细胞株 U937、小鼠淋巴细胞白血病细胞株 L1 210 的集落形成也有明显的抑制作用[7]。结合既往工作和其他学者研究推测:APS 既有促进正常血细胞发生,又有抑制白血病细胞增殖的双向调控作用,其机理有待深入研究。

自从 Sachs[8]报道恶性肿瘤细胞在某些诱导因素作用下可以逆转为较成熟或较良性细胞以来,肿瘤的诱导分化受到广泛关注。20 世纪 90 年代,我国临床上广泛用维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病,但发现长期使用易产生耐药和一些综合征[9]。可见寻找新的高效低毒的诱导分化剂,或联合用药来提高分化效应具有积极的意义。近年来,从天然药物中寻找肿瘤细胞的诱导分化剂已成为抗肿瘤药物研究的方向之一,并取得了令人瞩目的成就。

细胞分化的研究包括形态学分化、生物化学分化和功能分化等诸多方面。正常红细胞增殖分化成熟的形态演变规律是:细胞体积逐渐减小,细胞核内染色质逐渐致密,胞浆增多,核浆比例减小,胞浆嗜碱性逐渐减弱,胞浆中血红蛋白(Hb)逐渐出现并增多。从早幼红细胞阶段开始表现出合成 Hb,随着进一步分化成熟,Hb 含量持续增加。本研究通过形态学观察发现:经 APS 诱导后 K562 细胞有向幼红细胞分化的形态学表现,即 K562 细胞体积变小,核浆比例减小,细胞核与胞浆发育不平衡,胞浆嗜碱性减弱,嗜酸性增加,提示 APS 可以诱导 K562 细胞向红系分化。Hb 测定表明:APS 诱导后,K562 细胞合成血红蛋白的量增加,且与 APS 诱导剂量相关。但是本实验尚未观察到 APS 诱导 K562 细胞分化为更为成熟的红细胞,推测可能因素之一是在体外培养体系中 K562 细胞缺乏持续的红系造血生长因子支持,或是启动红系分化的信号转导途径受到阻滞。

有关 APS 诱导 K562 细胞向红系细胞分化的机

(下转第 12 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

液免疫为主。研究发现 BALB/c 鼠感染 Em 原头节 18 周(126 d)后,IFN-γ 和 TNF-α 水平降低,IL-4 水平增加,产生一个 T_H2 型免疫反应,类似上述结果。BCG 皮下注射组和空载体对照组 TNF-α 水平与 PBS 对照组相比轻微增加,提示 BCG 可刺激 Em 感染鼠的脾细胞分泌 TNF-α,发挥杀伤 Em 原头节的效应。

李富荣等[8,9]发现 AE 患者血清 IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 IL-4 水平明显升高,经阿苯哒唑治疗 12 月后 IL-2 和 IFN-γ 水平无明显变化,TNF-α 和 IL-4 水平显著降低。实验发现疫苗皮下注射组和鼻腔内接种组小鼠的脾细胞上清液 IFN-γ 和 TNF-α 明显增加,IL-4 水平显著降低,提示疫苗免疫可诱导 Em 感染鼠产生一个 T_H1 型保护性免疫反应,T_H1 细胞分泌的 IFN-γ 可激活巨噬细胞等效应细胞,促进其释放 NO,杀伤 Em 原头节;T_H1 细胞分泌的 IFN-γ 还可抑制 T_H2 细胞分泌 IL-4,从而减弱 T_H2 型反应;T_H1 细胞分泌的 TNF-α 可促进单核细胞分泌 TNF-α 和 IL-1,促进 T_H1 细胞分泌 IL-2 和 IFN-γ;T_H2 细胞分泌的 IL-4 水平降低,解除了对 T_H1 细胞的抑制效应,使 T_H1 细胞分泌较多的 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α;各种免疫细胞和细胞因子之间相互促进和相互调节,形成免疫调节网络,加强宿主 T_H1 反应,提高宿主抗泡球蚴感染的保护力。

实验还显示每个 EmAg 或 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的原液组,每个 ConA 刺激组的细胞因子水平显著高于相应的 EmAg 刺激组,可能是由于重组 Em14-3-3 抗原仅诱导其特异的 CD_4^+T 细胞增殖,因此丝裂原诱导的细胞因子水平可高于特异抗原诱导的水平。

参 考 文 献

[1] 李文桂,王 鸿,朱佑明.多房棘球绦虫重组 pBCG-Em14-3-3 重组质粒的构建及其在 BCG 中的表达 [J]. 中国人兽共患病学报,2006;22(12):1111-1114.

[2] 王 鸿,李文桂.多房棘球绦虫 Em14-3-3 抗原编码基因在 BCG 中的表达[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(3):299-301.

[3] Kizaki T,Ishige M, Kobayashi S, et al. Suppression of T cell proliferation by CD_8^+ T cells induced in the presence of protoscolices of Echinococcus multilocularis in vitro [J]. Infect Immun,1993;61(2):525-533.

[4] Emery I,Liance M,Leclerc C. Secondary Echinococcus multilocularis infection in A/J mice:delayed metacestode development is associated with T_H1 cytokine production[J]. Parasite Immunol,1997;19(11):493-503.

[5] Bresson HS,Petitjean O,Monnot JB,et al. Cellular localization of interleukin-1 beta,interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha mRNA in a parasitic granulomatous disease of the liver,alveolar echinococcosis[J]. Eur Cytokine Netw,1994;5(5):461-468.

[6] Wellinghausen N,Gebert P,Kern P. Interleukin-4,IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis[J]. Acta Trop,1999;73(2):165-174.

[7] 魏晓丽,丁剑冰,许 晏,等.小鼠感染泡球蚴后细胞因子水平的变化[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004;22(6):361-364.

[8] 李富荣,石佑恩,史大中,等.泡球蚴病患者血清中 T_H1/T_H2 型细胞因子水平的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002;20(6):376-377.

[9] 李富荣,石佑恩,史大中,等.阿苯哒唑治疗泡球蚴病患者血清中 T_H1/T_H2 型细胞因子的变化及临床意义 [J]. 中国人兽共患病杂志,2003;19(2):71-73.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 5 页)

理是否激活了细胞分化过程中的下游信号转导因子,我们正在做进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 王亚平,祝彼得.当归多糖的化学与药理学研究[M].第 4 册.北京:军事医学科学出版社,1996.365-374.

[2] Wang SL,Wang YP. Study on effect of angelica polysaccharide on modulation of human CFU-GM [J]. Acta Anatomica Sinica,2001;32(3):241-245.

[3] Zheng M,Wang YP. Experimental study on effect of angelica polysaccharide in inhibitory proliferation and inducing differentiation of K562 Cells[J]. Chin J Inte Trad West Med,2002;22(1):54-57.

[4] Wang SL,Wang YP. Experimental study of the effect of Angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of human CFU-GM and HL-60 cells[J]. J Chongqing Med Univ,2003;28(3):257-260.

[5] 刘志杰,钱新华,李西平,等.丁酸盐不同给药方式诱导 K562 细胞向红系分化的比较研究[J].第一军医大学学报,2001;21(12):890-893.

[6] 赵春红,侯 明.天然药物诱导分化研究现状[J]. 白血病淋巴瘤,2006;15(1):69-71.

[7] 李兴玉,丁慧芳.当归多糖对肿瘤细胞系的抑制效应[J]. 中国中西医结合杂志,1994;13(特集):135-137.

[8] Sachs L.The molecular regulators of normal and leukaemic blood cells[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci,1987;231(1 264):289-312.

[9] 王振义.诱导分化治疗中的问题[J]. 中国肿瘤,2002;11(1):3-4.

(责任编辑:谭东勤)