维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)06-0774-03

人参总皂甙对 K562 细胞 Fas 及其可溶性受体的影响

曹唯希[1], 陈婷梅[2], 刘 琼[3], 王亚平[4], 姜 蓉[4]

(1.重庆医科大学检验系临床检验诊断学重点实验室;2.检验系临床免疫学教研室;
3.重庆市中医研究所;4.基础医学院组胚教研室;重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人参总皂甙(TSPG)诱导 K562 细胞凋亡的机理。方法:采用形态学观察、原位末端标记法(TUNEL)观察不同浓度人参总皂甙对 K562 白血病细胞凋亡的影响;用免疫组化法检测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡中 Fas 表达情况,并采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测可溶性 Fas(sFas)。结果:50、100μg/ml TSPG 可诱导 K562 细胞凋亡;同时实验组 Fas 表达明显增高($P<0.01$),而 sfas 无明显变化。结论:TSPG 诱导 K562 细胞凋亡与其诱导细胞 Fas 高表达有关。

【关键词】人参总皂甙;K562;凋亡;Fas;sfas
【中国图书分类法分类号】R733.7;R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-21

Effect of TSPG on apoptosis of K562 cells and the expression of Fas, sfas

CAO Weixi, et al

(*Chongqing Key Laboratory Medical Diagnosis, Faculty of Laboratory, Chongqing Medical Sciences*)

【Abstract】*Objective*: Our purpose is to clarify the mechanisms for total saponins of Panax ginseng(TSPG) inducing K562 cells to apoptosis. *Methods*: By using morphological observation and TUNEL, the effect of TSPG on apoptosis of K562 cells were studied. The expression of Fas was studied by immunocytochemistry, and sfas was assayed by ELISA. *Results*: The results indicated that 50, 100μg/ml TSPG could induce K562 cells to apoptosis. Our experiment also showed after induced by TSPG, the ratio of positive K562 cells of expression Fas is increased ($P<0.01$), while sfas had no change. *Conclusion*: The mechanisms for TSPG inducing K562 cells to apoptosis may be related to the increased expression of Fas in K562 cells.

【Key words】TSPG;K562;Apoptosis;Fas;sfas

人参是祖国传统医学的"补气"要药,人参皂甙是其中的主要药物成分。既往研究结果表明:人参皂甙(Total Saponins of Panax Ginseng, TSPG)TSPG 能促进造血干/祖细胞增殖分化及其信号转导[1],并能诱导 K562 细胞向较成熟红、粒细胞分化[2]。本文探讨 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的中药诱导剂——TSPG 提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器

1.1.1 人红白血病细胞株 K562 细胞,由本校临床生化教研室提供,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 常规传代培养。

1.1.2 人参总皂甙由重庆医科大学基础医学院王亚平教授惠赠,纯度为 95% 以上,用 PRMI-1640 配制成所需浓度。TUNEL 试剂盒购于 Roche 公司。Fas 单抗、SP 免疫组化染色购自北京中山试剂公司。sfas 检测 ELISA 试剂盒由美国圣地亚哥肿瘤研究所罗云平博士惠赠。

1.1.3 酶标仪 Bio-Rad 公司

1.2 方法

1.2.1 取对数生长的 K562 细胞,使终浓度为 1×10^5/ml。1)对照组:培养体系中加与药物等量的 RPMI-1640 液;2)实验组:培养体系中加入 TSPG,使其终浓度为 50μg/ml,100μg/ml,200μg/ml。

1.2.2 细胞光镜形态学观察 取各实验组(50μg/ml,100μg/ml,200μg/ml 分别作用 3,6,9 天)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。同时用图象分析仪随机测量 300 个细胞,计算凋亡细胞的百分率。

1.2.3 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,经脱水、环氧树脂包埋超薄切片,染色后用

作者介绍:曹唯希(1963-),女,实验师,
主要研究方向:白血病细胞逆转分化和凋亡及其机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

H-600 透射电镜观察。

1.2.4 TUNEL 测定细胞凋亡 方法按试剂盒说明书进行。

1.2.5 sfas 检测 采用 ELISA 双抗体夹心法。分别在 3,6,9 天取对照组、实验组培养上清液,-20℃保存、备用;操作按试剂盒说明书进行,结果于酶标仪 450nm 处读取光密度值。用不同浓度 sFas 标准品绘制标准曲线,即可在曲线上用所测得的标本光密度值求得相应的 sFas 浓度。

1.2.6 Fas 检测 取对照组和实验组细胞用 PBS(pH 7.4)洗 3 次,涂片;加过氧化酶阻断剂,室温 10min;加封闭血清,室温 15min,加 Fas—抗,4℃过夜;次日取出,PBS 洗 3 次,加链亲和素—过氧化物酶;加新鲜配制 DAB 溶液,用水冲洗,苏木素复染;阴性对照以 PBS 代替一抗。用图象分析仪计数 300 个细胞/例,计算阳性细胞率。

2 结 果

2.1 TSPG 对 K562 细胞凋亡的影响

形态学观察 经 50μg/ml、100μg/ml、200μg/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,胞核断裂呈小块或碎片状,但细胞膜完整(图 1,2)。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、100μg/ml TSPG 为 6 天(其凋亡细胞百分率分别为 16.3%,21.5%)。200μg/ml TSPG 为 3 天(凋亡细胞百分率为 14.1%)。通过形态学观察,发现 200μg/ml TSPG 作用 K562 细胞 6 天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;200μg/ml TSPG 作用至 9 天,坏死细胞百分率达 42%。而 50μg/ml、100μg/ml TSPG 在整个观察时期内少见细胞坏死。由此可见,200μg/ml TSPG 作用于 K562 细胞作用较为强烈,可能多为细胞毒作用。因此选择作用较为温和的 50μg/ml、100μg/ml 浓度进行以下实验。

2.2 TUNEL 测定细胞凋亡

经 50μg/ml、100μg/ml TSPG 作用 1,3,6 天的 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 3),但各个检测时间段内结果无明显差异。

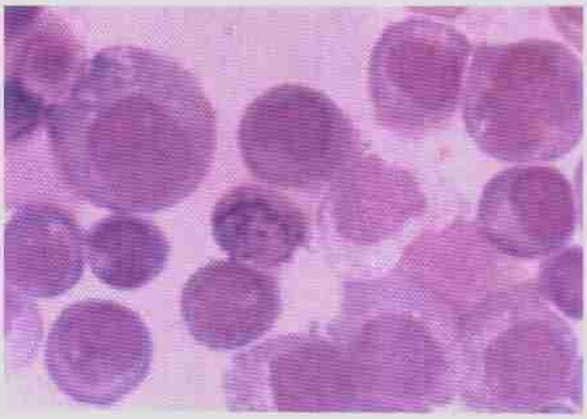


图 1 50μg/mL TSPG 作用 K562 细胞 6 天
(瑞氏染色 ×1000)

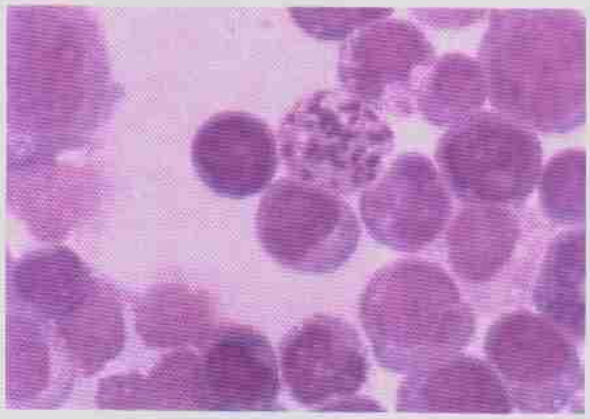


图 2 100μg/mL TSPG 作用 K562 细胞 6 天

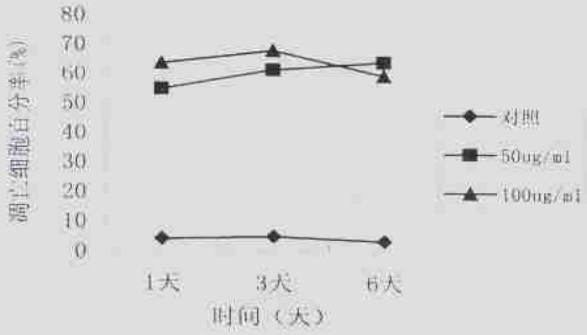


图 3 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡

表 1 TSPG 对 K562 细胞 Fas 表达的影响

药物浓度	Fas 阳性率($\bar{x}\pm s$)%	
	6 天	9 天
对照	13.93±2.56	15.26±3.86
50μg/ml	36.26±3.22*	41.62±1.22*
100μg/ml	39.03±4.85*	37.41±3.54*

*$P<0.01$ vs control

2.3 TSPG 对 K562 细胞 Fas 表达的影响

Fas 在对照组 K562 细胞有一定表达阳性率为 13.93%,50、100μg/ml TSPG 作用 6 天,K562 细胞的 Fas 表达增高,与对照组比较有统计学意义(表 1)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 TSPG 对 K562 细胞 sFas 表达的影响

结果显示,在观察时间内实验组、对照组 sFas 水平无明显变化。

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。凋亡细胞核 DNA 断裂成 180～200bp 的小片段,其主要形态学特征是细胞胞浆浓缩致密,核染色质凝集,核裂解,最终形成凋亡小体。本文从形态学和 TUNEL 检测来观察不同浓度 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡的发生,从光镜、电镜观察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:50μg/ml,100μg/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。此外,由于跨膜区的缺失,Fas 可从细胞膜上脱落形成可溶的 sFas,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]。

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]。实验发现 50μg/ml、100μg/ml TSPG 诱导 K562 细胞凋亡中,可使 K562 Fas＋细胞百分率升高,而实验组、对照组 sFas 的改变无明显差异,由此可初步推测 TSPG 诱导 K562 细胞凋亡可能与细胞 Fas 升高及其所产生的受体效应有关,而与 sFas 作用无关。此外,有文献报道急性白血病细胞可自分泌 TNF[6],TSPG 诱导 K562 细胞 Fas 表达升高,是否可增加该部分细胞对自分泌 TNF 敏感性而促进细胞凋亡,这需要进一步研究。

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] 陈婷梅,王亚平. 人参总皂甙对 K562 细胞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):115－116.

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

[4] Nagatas. The Fas death factor[J]. Science, 1995;267:1449－1455.

[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] 罗云萍,黄宗干. IL－6 和 TNF 对白血病细胞的调控作用及意义[J]. 上海免疫学杂志,1996;16:169－171.