DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.22.023
第25卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 22
2018 2003年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)22-2018-04

人参皂甙协同EPO和GM-CSF对K562细胞诱导分化的实验研究

陈地龙,王亚平,陈婷梅 (重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 研究人参总皂甙(Total saponins of panax ginseng, TSPG)协同细胞因子(EPO、GM-CSF)对人红白血病细胞株(K562)诱导分化的影响。方法 采用细胞体外培养技术,光镜和电镜观察细胞形态变化;联苯胺染色、POX染色、α-NAE细胞化学染色分别检测细胞血红蛋白、过氧化物酶、非特异性脂酶α-NAE;免疫细胞化学检测细胞表面分化抗原CD15、HIR2、EPO-R、GM-CSF-R。结果 TSPG协同细胞因子对K562细胞的诱导作用与TSPG单独作用相比,①K562细胞形态学更趋向于成熟;②K562细胞血红蛋白(Hb)、过氧化物酶(POX)的表达明显增加;③细胞表面分化抗原CD15、HIR2、EPO-R、GM-CSF-R的表达明显增强。结论 TSPG协同细胞因子作用能明显诱导K562细胞向成熟方向分化。

关键词:人参总皂甙;细胞因子;K562;诱导分化
中图法分类号:R282.71;R73-354;R733.7 文献标识码:A

Effects of TSPG combined with EPO or GM-CSF on differentiation of K562 cells

CHEN Di-long, WANG Ya-ping, CHEN Ting-mei (Department of Histology and Embryology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of total saponins of Panax ginseng (TSPG) combined with erythropoietin (EPO) or granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on the differentiation of K562 cells. Methods Cells were cultured *in vitro*. Morphologic changes of cells were observed with light microscope and electron microscope. The levels of hemoglobin, peroxidase, non-specific lipase α-NAE in cells were detected respectively by benzidine staining, peroxidase (POX) staining and α-NAE cytochemical staining. Levels of cell surface differentiation antigens CD15, HIR2, EPO-R and GM-CSF-R were determined by immunocytochemistry. Results TSPG combined with EPO or GM-CSF resulted in more mature morphological features of K562, increased expressions of hemoglobin and myeolperoxidase in K562 cells, and enhanced expressions of cell surface differentiation antigens CD15, HIR2, EPO-R and GM-CSF-R. Conclusion TSPG combined with cytokine EPO or GM-CSF can induce more mature differentiation of K562 cells.

Key words: saponins of Panax ginseng; cytokine; K562; differentiation

白血病是严重危害人类生命健康的造血系统恶性肿瘤,迄今白血病的治疗仍主要采用传统的联合化疗,但此疗法副作用甚大,复发率高,尤其对机体免疫与造血系统有较大的损害。我们既往的研究表明[1~4],人参皂甙能促进正常血细胞生成,并能抑制白血病细胞的增殖,但这种双向调控的机制尚不清楚。本研究采用实验血液学技术,研究人参总皂甙(Total saponins of panax ginseng, TSPG)协同细胞因子对人红白血病细胞(K562)的诱导分化作用,旨在阐述人参对白血病细胞发生的调控机制,为研制开发天然中药分化诱导剂提供理论与实验依据。

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:陈地龙(1971—),男,重庆市万州区人,博士研究生,讲师,主要从事造血调控机制方面的研究。电话:(023)68485614
收稿日期:2003-04-28;修回日期:2003-07-13

1 材料与方法

1.1 人参总皂甙

重庆中药研究所惠赠,为人参的总皂甙,通过酶法精制,纯度98%以上,以RPMI1640培养液配制成所需浓度(5 mg/ml),过滤除菌。

1.2 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)

购自北京北医联合生物工程公司。活性1×10^7 IU/mg,RPMI1640培养液稀释为1×10^4 IU/ml。

1.3 促红细胞生成素(EPO)

美国Amgen公司产品,活性10^5 U/ml。PRMI1640培养液稀释为100 U/ml。

1.4 K562细胞(人红白血病细胞株)

重庆医科大学临床生物化学教研室惠赠,在含10%小牛血清的RPMI1640培养液中常规培养,每2~3天换液传代。

1.5 主要药品与试剂

RPMI1640培养基,美国GIBCO公司产品;小牛血清(BS),

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

杭州四季清公司; 大鼠抗人 EPO 受体单克隆抗体, 晶美生物工程有限公司产品; 大鼠抗人 GM-CSF 受体单克隆抗体, 美国 Pharmingen 公司产品; 小鼠抗人 CD15 单克隆抗体, 北京中山生物技术公司产品; 抗人血型糖蛋白-2(HIR2), 军事医学科学院产品; DAB 试剂盒, 北京中山生物技术有限公司产品。

1.6　诱导分化实验

1.6.1　TSPG 与 TSPG 协同细胞因子对 K562 细胞诱导分化的光镜形态学观察　　取处于对数生长期的 K562 细胞培养进行诱导分化实验。对照组: 常规培养; TSPG 组: 培养体系中加入 TSPG(终浓度为 100、200 μg/ml); TSPG+EPO 组: 除加入 TSPG 外, 同时加入 EPO(1 U/ml); TSPG+GM-CSF 组: 加入 TSPG 同时加入 GM-CSF(100 U/ml)。分别在培养第 3、6 天取样, 经细胞离心涂片后进行瑞特染色, 光镜下观察细胞形态, 同时每例用图像分析仪随机测量 300 个细胞的体积、直径, 计算核/浆比例。

1.6.2　TSPG 诱导后 K562 细胞超微结构观察　　取对数生长期的 K562 细胞进行分组培养, 对照组: 常规培养; TSPG 单独诱导组: 培养体系中加入 TSPG(终浓度为 100～200 μg/ml); TSPG 与细胞因子联合诱导组: 培养体系中加 TSPG+EPO(1 U/ml)或 GM-CSF (100 U/ml), 在培养第 6 天取样, 经 2.5% 戊二醛固定 1 h, 电镜常规超薄切片制备, H-600 型透射电镜观察与摄片。

1.6.3　TSPG 与 TSPG 协同细胞因子诱导 K562 细胞的细胞化学与免疫细胞化学检测　　按 1.6.1 分组培养 K562 细胞, 细胞经离心涂片, 分别进行联苯胺染色, POX 染色、α-NAE 细胞化学染色, 另以大鼠抗人 EPO 受体、GM-CSF 受体单克隆抗体进行免疫细胞化学 SP 法染色, 每例用图像分析仪计数 300 个细胞, 计算阳性细胞表达率。

1.7　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 协同细胞因子对 K562 细胞诱导的形态学影响

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, 见图 1。经 TSPG 100、200 μg/ml 诱导 6 d 后, 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, 胞浆丰富, 核浆比例降低, 见图 2。TSPG 与 GM-CSF 或 EPO 协同诱导 6 d 后, K562 细胞直径和体积有进一步变小的趋势, 见表 1。细胞向成熟方向分化趋势更明显, TSPG 与 EPO 作用 K562 细胞有向红系分化的趋势, 与 GM-CSF 作用 K562 有向粒单系分化的趋势, 见图 3、4。

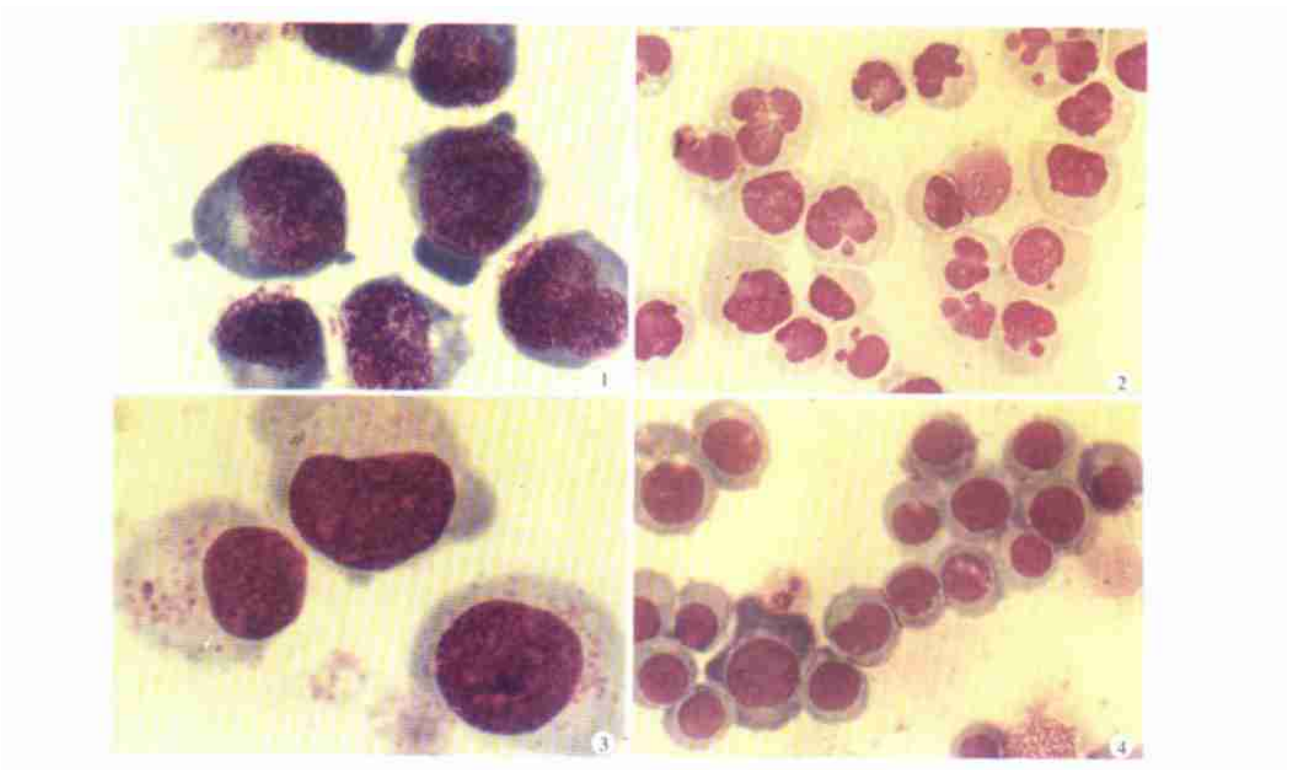


图 1　对照 K562 细胞　(瑞特染色×1000)

Fig 1　K562 cells in the control group　(Wright staining × 1000)

图 2　TSPG(100 μg/ml)诱导 6 d K562 细胞　(瑞特染色×400)

Fig 2　K562 cells on day 6 after induction with TSPG (100 μg/ml)　(Wright staining ×400)

图 3　TSPG(100 μg/ml)+GM-CSF(100 U/ml)诱导 K562 细胞 3 d　(瑞特染色×1 000)

Fig 3　K562 cells on day 3 after induction with TSPG(100 μg/ml) + GM-CSF(100 U/ml)　(Wright staining × 1 000)

图 4　TSPG(100 μg/ml)+EPO(1 U/ml)诱导 K562 细胞 6 d　(瑞特染色×400)

Fig 4　K562 cells on day 6 after induction with TSPG(100 μg/ml)+EPO(1 U/ml)　(Wright staining×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 TSPG协同EPO或GM-CSF对K562细胞形态分化的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of TSPG combined with EPO or GM-CSF on the morphodifferentiation of K562 cells($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Control (6 d)	TSPG (6 d)	TSPG+EPO (6 d)	TSPG+GM-CSF (6 d)
Cell diameter(μm)	35.15±7.86	21.86±2.53	21.16±2.94	28.08±3.28
Cell volume (μm^2)	810.76±291.56	372.92±78.30	355.04±84.80	309.04±84.80
Nucleus/cytoplasm ratio(%)	86.00±17.00	71.00±15.00	67.00±11.00 *	50.00±7.70 **

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* untouched; Final concentration of TSPG: 100 μg/ml; Final concentration of EPO: 1 U/ml; Final concentration of GM-CSF: 100 U/ml

TSPG与GM-CSF、EPO协同诱导K562细胞后，电镜观察可见细胞体积明显缩小，核内异染色质增多，电子密度增加，核仁减小或消失，胞浆增多，胞浆中细胞器增加，出现溶酶体，也可见血红蛋白颗粒，部分细胞呈类早、中、晚幼红细胞及粒单系早、中期细胞细胞化学变化，见图5~7。

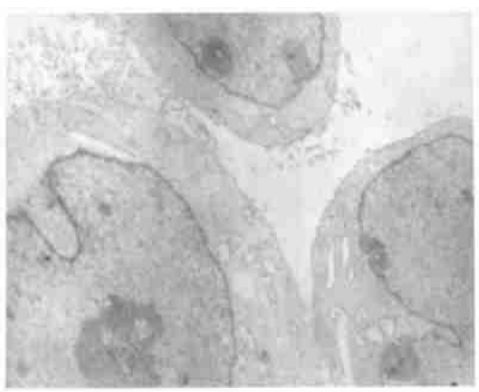


图5 对照K562细胞 (TEM×6 000)

Fig 5 K562 cells in the control group (TEM×6 000)

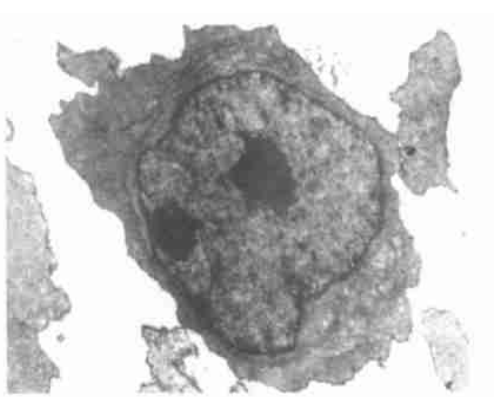


图6 TSPG(100 μg/ml)+EPO(1 U/ml)诱导K562细胞6 d (TEM×8 000)

Fig 6 K562 cells on day 6 after induction with TSPG(100 μg/ml)+EPO(1 U/ml) (TEM×8 000)

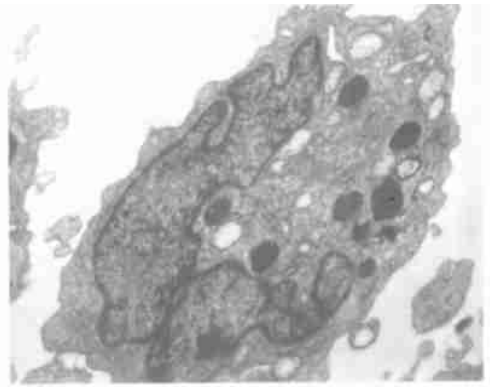


图7 TSPG(100 μg/ml)+诱导K562+GM-CSF(100 U/ml)细胞6 d (TEM×15 000)

Fig 7 K562 cells on day 6 after induction with TSPG(100 μg/ml)+GM-CSF(100 U/ml) (TEM×15 000)

2.2 TSPG协同细胞因子诱导K562细胞分化的细胞化学改变

未经TSPG作用的K562细胞联苯胺染色反应阳性率为5%，POX反应阳性率为15%。经TSPG+EPO或GM-CSF诱导K562细胞6 d后血红蛋白、过氧化物酶均有所提高，联苯胺染色阳性率提高到28%，POX阳性率提高到66%，与对照组相比有明显差异，α-NAE无阳性表达，见表2。

表2 TSPG协同细胞因子对K562细胞Hb、POX表达的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of TSPG combined with cytokines on the expressions of Hb, POX and α-NAE in K562 cells(%，$\bar{x}\pm s$)

Parameter	Postive ratio			
	Control 6 d	TSPG 6 d	TSPG+EPO 6 d	TSPG+GM-CSF 6 d
Bezidine reaction	5±1.2	28±3.6 *	34±1.9 *	21±5.6 *
POX reaction	15±0.8	66±8.2 *	62±9.3 *	69±8.5 *
α-NAE reaction	0	0	0	0

*: $P<0.01$ *vs* control; Final concentration of TSPG: 100 μg/ml; Final concentration of EPO: 1 U/ml; Final concentration of GM-CSF: 100 U/ml

2.3 TSPG协同细胞因子诱导对K562细胞分化抗原表达的影响

TSPG协同EPO、GM-CSF诱导K562细胞6 d，利用免疫细胞化学检测细胞表面分化抗原、图像分析仪计算CD15、HIR2阳性率，结果显示：HIR2和CD15表达明显提高，见表3。

表3 TSPG协同细胞因子对K562表面分化抗原CD15、HIR2表达的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of TSPG combined with cytokines on expressions of CD15 and HIR2 in K562 cells(%，$\bar{x}\pm s$)

Condition	Positive ratio			
	Control 6 d	TSPG 6 d	TSPG+EPO 6 d	TSPG+GM-CSF 6 d
HIR2	19.91±2.13	56.27±10.78 *	89.93±3.98 *	68.47±4.55 *
CD15	3.05±0.38	12.96±1.62 *	15.98±5.78 *	18.77±4.87 *

*: $P<0.01$ *vs* control; Final concentration of TSPG: 100 μg/ml; Final concentration of EPO: 1 U/ml; Final concentration of GM-CSF: 100 U/ml

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　TSPG 协同细胞因子对 K562 表达 EPO 受体、GM-CSF 受体蛋白的影响

TSPG 协同 EPO 或 GM-CSF 诱导 K562 细胞 6 d, 结果显示: 经 TSPG 诱导后 K562 细胞, EPO 受体与 GM-CSF 受体蛋白表达明显增强。TSPG 协同 EPO、GM-CSF 作用后 K562 细胞 EPO-R、GM-CSF-R 的表达较对照组有显著性差异, 而与 TSPG 单独作用相比无统计学意义。

表 4　TSPG 及 TSPG 协同 EPO、GM-CSF 对 K562 细胞表达 EPO、GM-CSF 受体蛋白的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of TSPG combined with combined with EPO or GM-CSF on the expressions of EPO-R and GM-CSF-R in K562 cells(%, $\bar{x}\pm s$)

Condition	Positive ratio			
	Control 6 d	TSPG 6 d	TSPG+EPO 6 d	TSPG+GM-CSF 6 d
EPO-R	21.35±4.08	76.31±33.03*	75.86±1.98*	71.67±2.62*
GM-CSF-R	26.84±7.50	82.23±6.23*	81.77±6.85*	85.43±3.75*

*: $P<0.01$ *vs* control; Final concentration of TSPG: 100 μg/ml; Final concentration of EPO: 1 U/ml; Final concentration of GM-CSF: 100 U/ml

3　讨论

研究白血病细胞的诱导分化及逆转机制已成为当今生物医学领域内最热点的课题之一[5~7]。从祖国医学宝库中寻找抑制白血病细胞恶性增殖并诱导其向成熟方向分化的中药诱导分化剂是值得探索的途径之一。我们用 TSPG 协同细胞因子(EPO、GM-CSF)诱导 K562 细胞, 对其形态学、细胞化学、细胞表面分化抗原等方面进行了探讨。

我们的实验结果表明: TSPG(100~200 μg/ml)诱导 K562 后, K562 细胞在形态上趋向粒、红系细胞分化。经 TSPG 诱导后, K562 细胞 CD15 的表达增强, 且随着时间延长, 表达增强的程度也增加; 同时 K562 细胞表达 HIR2 增强。结合形态学指标、酶化学与免疫标志检测, 我们认为: TSPG 能诱导 K562 细胞向红系与粒系方向分化。但我们注意到 TSPG 持续作用后, K562 细胞并没有继续分化成为更成熟的细胞, 而且 K562 细胞核与胞浆发育不平衡, 我们推测可能原因在于 TSPG 诱导后调节 K562 细胞分化状态, 诱导后继续分化成熟需要造血生长因子的作用。不同发育阶段与不同系的造血细胞表达不同造血生长因子(HGF)受体, 依赖不同 HGF 刺激[8,9]。因此我们观察了 TSPG 与 EPO、GM-CSF 协同作用对 K562 细胞诱导分化的影响。实验结果表明: TSPG 协同 EPO、GM-CSF 两种细胞因子进行诱导后, 细胞直径与细胞体积较 TSPG 单独作用有进一步变小的趋势, 而核浆比例进一步变小。表明 TSPG 能协同细胞因子进一步促进 K562 细胞向成熟方向分化的趋势, 形态学上更趋向红系与粒系细胞的特点。细胞化学结果表明: TSPG 协同 EPO 作用 K562 细胞的 HIR2 的表达较 TSPG 单独作用明显增强, 而 CD15 的表达无显著性差异。TSPG 协同 GM-CSF 作用后, K562 细胞的 HIR2 表达无显著差异, 而 CD15 的表达明显增强。

EPO-R、GM-CSF-R 的检测表明在 K562 细胞经 TSPG 诱导后, 二者受体的表达阳性率明显增强, 但 TSPG 单独诱导与 TSPG 协同 EPO 或 GM-CSF 诱导之间并无显著差异。我们推测: TSPG 能促进 K562 细胞 EPO-R、GM-CSF-R 受体的表达, 而 EPO、GM-CSF 这两种细胞因子不能加强 K562 细胞的受体表达, 很可能是通过增强 EPO-R、GM-CSF-R 的活性而增强对细胞因子的灵敏性。可见 TSPG 协同 EPO 能促进 K562 细胞向红系继续分化的作用; TSPG 协同 GM-CSF 能促进 K562 细胞向粒系进一步分化。我们推测 TSPG 促进 K562 细胞成熟分化的作用机理可能是 TSPG 促进 K562 细胞 EPO-R、GM-CSF-R 的表达, 受体与相应造血生长因子结合最终导致细胞向某一细胞系分化。

我们既往研究证明[1,2] TSPG 对造血干细胞的增殖分化有明确的刺激作用, 而对白血病细胞的增殖有抑制作用。本研究进一步证明: TSPG 能有效诱导 K562 细胞向成熟方向分化, 协同细胞因子后仍有进一步分化的趋势, 但未见功能和形态十分正常的血细胞, 我们认为造血发生是一个复杂的过程, 我们正在对白血病细胞癌基因的转录及信息调控进行研究之中。

参考文献:

[1] 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): 115-199.

[2] 王亚平, 王　勇. 中药药理与临床研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1996. 273-283.

[3] 王　勇, 祝彼得, 王亚平. 人参总皂甙对造血生长因子产生的影响[J]. 免疫学杂志, 1996, 12(1): 25-27.

[4] 王　勇, 王亚平, 祝彼得. 人参总皂甙对小鼠造血细胞增殖的影响[J]. 解剖学杂志, 1995, 18(2): 153-156.

[5] 曾小莉, 涂植光. 人参总皂甙对人肝癌细胞胞浆中某些表型的逆转作用[J]. 癌症, 2000, 19(8): 776-778.

[6] 高瑞兰, 牛泱平, B.H. Chong. 人参总皂甙对白血病祖细胞作用的实验观察[J]. 上海中医药杂志, 1999, (9): 46-48.

[7] 孙宪寿. 白血病细胞诱导分化的研究进展[J]. 基础医学与临床, 1995, 15(3): 10.

[8] 孙卫民. 细胞因子研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 278-304.

[9] 刘景生, 肖殿模. 细胞信息与调控[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 64-154.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net