

人参皂苷 Compound K 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞系凋亡诱导作用及其机制的研究

蒋传命, 黄泽智, 杨 秦, 周 雨

(邵阳医学高等专科学校, 湖南 邵阳 422000)

摘 要: [目的] 探讨人参皂苷 Compound K (CK) 对慢性粒细胞白血病 K562 细胞凋亡的诱导作用及其机制。[方法] 应用 MTT 法检测 CK 对 K562 细胞增殖的影响, 用流式细胞术分析细胞凋亡情况, 半定量 RT-PCR 检测 *Caspase3*、*Caspase9*、*Bcl-2* 和 *Bax* 的 mRNA 表达水平, Western Blot 检测 *Caspase3*、*Caspase9*、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白质的表达。[结果] 人参皂苷 CK 能诱导 K562 细胞的凋亡, 细胞凋亡率呈浓度依赖性增加。RT-PCR 结果显示 *Caspase3*、*Caspase9* mRNA 的表达上调, *Bcl-2* mRNA 的表达下调, Western Blot 实验显示蛋白质表达情况与 RT-PCR 结果一致, *Caspase3*、*Caspase9* 蛋白质的表达上调, *Bcl-2* 的表达下调。[结论] 人参皂苷 CK 诱导 K562 细胞凋亡作用的机制可能是 CK 抑制 *Bcl-2* 基因的表达, 进而使 *Caspase3*、*Caspase9* 表达量上调, 启动凋亡途径, 引起凋亡。

主题词: 人参皂苷 CK; K562 细胞; 细胞凋亡; 白血病

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0122-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B009

Effect of Apoptosis Inducing of Ginsenoside Compound K on Chronic Myelocytic Leukemia K562 Cells and Its Mechanism

JIANG Chuan-ming, HUANG Ze-zhi, YANG Qin, et al.

(Shaoyang Medical College, Shaoyang 422000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the apoptosis of Ginsenoside CK on the K562 cells and its mechanism. [Methods] The proliferation inhibition effects of Ginsenoside CK on the K562 cells were determined by MTT assay. K562 cells apoptotic percentage was detected by flow cytometry. The mRNA expression of *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* was detected by semi-quantitative RT-PCR. Western Blot assay was carried out to examine *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* protein expression. [Results] Ginsenoside CK significantly inhibited the proliferation of K562 cells in dose-dependent and time-dependent manners. In addition, apoptosis percentage of K562 cells can be induced by Ginsenoside CK in dose-dependent manner. The expression of *Caspase3*, *Caspase9* mRNA was obviously up-regulated, while the *Bcl-2* expression was down-regulated. The result of Western Blot assay was accord with that of RT-PCR. The expression of *Caspase3*, *Caspase9* protein was obviously up-regulated, while the *Bcl-2* expression was down-regulated. [Conclusion] Ginsenoside CK plays a crucially important role in exerting its anti-leukemic effects via induction of apoptosis in K562 cells. This effect is possibly to inhibit *Bcl-2* expression, which may occur apoptosis through decreasing *Bcl-2* expression down-regulated by caspase pathway.

Subject words: Ginsenoside CK; K562 cells; apoptosis; leukemia

人参是我国传统医学中著名的中药材, 其用途非常广泛, 有效成分主要是人参皂苷。现已分离出了 40 余种人参皂苷, 按其皂苷元母核结构可分为齐墩果酸类、原人参二醇类和原人参三醇类。人参皂苷 Compound K (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, CK) 属二醇型皂苷, 它在天然的人参中并不存在, 是

其他二醇型人参皂苷在人体肠道内的降解产物。本实验拟探讨人参皂苷 CK 对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞诱导凋亡的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

人参皂苷 Compound K 购自上海亚培生物科技有限公司, 纯度 ≥ 98%。RPMI-1640 培养基购自美国

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目基金 (11C1159)

通讯作者: 蒋传命, 讲师, 硕士; 邵阳医学高等专科学校, 湖南省邵阳市大祥区宝庆西路 18 号 (422000); E-mail: chuanmingj78@163.com

收稿日期: 2013-07-26; **修回日期:** 2013-09-13

Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自 Sigma 公司;Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司;Caspase3、Caspase9、Bcl-2、Bax 抗体(Cell Signaling Technology 公司),GAPDH 抗体(艾美捷科技公司);HRP 标记羊抗兔二抗(康为世纪生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

人慢性粒细胞白血病细胞株 K562 细胞购自中国典型培养物保藏中心(湖北武汉)。用含 10%小牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37℃、5%CO₂、95%饱和湿度中培养。细胞悬浮生长于培养基中,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法测定 CK 对 K562 细胞增殖的影响

取对数生长期 K562 细胞 2×10⁴/ml 的单细胞悬液以每孔 200μl 体积接种 96 孔板,加入 CK(使其终浓度达 10、20、40、60、80μmol/L)处理,设 6 个复孔,以未加药组作为对照;在 37℃、5%CO₂ 及 95%饱和湿度下,培养 24、48、72h;每孔加入 MTT 溶液 (5g/L)20μl,37℃继续培养 4h,终止培养;离心(1 000r/min,15min),然后弃去孔内培养液,每孔加入 200μl DMSO,振荡 10min,使结晶充分溶解后,在酶联免疫检测仪上 570nm 波长测定各孔吸光度。抑制率(IR) = (A_{无药组} - A_{用药组}) / A_{无药组} × 100%。根据细胞抑制曲线计算半数有效浓度(IC₅₀)。以上实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

用不同浓度的 CK(0、100、200、400μmol/L)处理 K562 细胞 24h,另设空白对照组和 DMSO 对照组,1 000r/min 离心 5min,弃去培养液,收集细胞,PBS 清洗,调整各组细胞数为 1×10⁶/ml,取 400μl 细胞悬液,加入 200μl PBS 洗涤,弃上清,加入 400μl binding buffer 和 10μl Annexin V-FITC(20μg/ml),混匀,4℃避光孵育 15min,再加 5μl 碘化丙啶(PI)(20μg/ml)于细胞悬液中,混匀,4℃避光孵育 5min,室温放置 10min,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 RT-PCR 法检测 Caspase3、Caspase9、Bcl-2、Bax mRNA 的表达

取对数生长期 K562 细胞,以 2×10⁵/ml 细胞悬液接种于培养瓶,分别用 0、100、200、400μmol/L 的 CK 处理细胞 24h,收集细胞。以 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,测 A₂₆₀/A₂₈₀ 分析 RNA 纯度及含量。RT-PCR 反应按上海生工公司的 MMLV 产品说明书进行操作,PCR 引物由上海生工公司合成(Table 1)。PCR 参数:94℃预变性 5min;94℃变性 45s,55℃退火 45s,72℃延伸 50s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外拍照,并用凝胶图像分析系统软件分别测定样品目的基因条带与内参基因 GAPDH 的比值,表示目的基因的相对含量。

Table 1 The primer sequence

Gene		Primer sequence	Fragment(bp)
Bcl-2	Forward primer	5'-AGCC ACCC AGGG TGAT GCAA-3'	304
	Reverse primer	5'-GTGG AGGA GCTC TTCA AGGA-3'	
Bax	Forward primer	5'-ATGT CAAA GGTG CGAG TGTC-3'	289
	Reverse primer	5'-TCTG TAGT AGAA CTCG GGCAA-3'	
Caspase3	Forward primer	5'-TTTT TCAG AGGG GATC GTTG-3'	296
	Reverse primer	5'-TCAA GCTT GTCG GCAT ACTG-3'	
Caspase9	Forward primer	5'-CTAG TTTC CCCA CACC CATG-3'	172
	Reverse primer	5'-GCAT TAGC GACC CTAA GCAG-3'	
GAPDH	Forward primer	5'-GTGG GGCG CCCC AGGC AGGC ACCA-3'	540
	Reverse primer	5'-CTCC TTAA TGTC ACGC AGGA TTTC-3'	

1.2.5 Western Blot 法检测 Caspase3、Caspase9、Bcl-2、Bax 蛋白质的表达

收集 0、100、200、400μmol/L 不同浓度 CK 处理 24h 的 K562 细胞,将细胞悬浮于 5 倍体积的细胞裂解缓冲液中(PMSF 试剂)于冰上裂解 10min 提取蛋白。BSA 试剂盒进行蛋白质定量。进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,按 Western Blot 方法,电转移至硝酸纤维素膜,以封闭液(5%脱脂奶粉)封闭,0.1%TTBS 清洗后,分别加入 Caspase3、Caspase9、Bcl-2 和 Bax 一抗,于 4℃温育 2h。抗体按照说明书以 1:2 000 稀释。加入稀释的 HRP 标记的二抗工作液,于 37℃温育 1h。化学发光法显色,X 射线底片曝光(按试剂盒说明书操作)。胶片扫描,输入计算机,对目的条带以全自动图像分析系统进行定量分析,计算其积分吸光度,以与内参 GAPDH 吸光度值之比反映各蛋白质表达水平的改变。

1.2.6 统计学处理

用 SPSS16.0 进行统计学处理, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析采用 *t* 检验, 组内采用 One Way ANOVA 进行方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CK 抑制 K562 细胞的增殖活性

MTT 检测结果, 不同浓度的 CK 处理 K562 细胞 24、48、72h 后, 细胞增殖活性明显受到抑制。在 10~80 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内, CK 的抑制效应随药物浓度增加而增强, 呈剂量依赖性, CK 与 K562 细胞共培养 72h 的半数抑制浓度 IC_{50} 为 $(48 \pm 0.7) \mu\text{mol/L}$ 。在 24、48、72h 三个作用时间内, 作用 48h 后能显著抑制细胞生长, 72h 达到抑制率高峰, 其抑制效应呈现时间依赖性 (Figure 1)。

2.2 CK 对 K562 细胞凋亡的影响

在不同浓度 (0、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$) 的 CK 作用 K562 细胞 48h 后, 3 个不同浓度的人参皂苷 CK 作用组细胞凋亡率分别为 $16.09\% \pm 1.85\%$ 、 $33.39\% \pm 1.36\%$ 、 $45.55\% \pm 1.86\%$, 而对照组细胞凋亡率为 $3.89\% \pm 0.07\%$, 加药组与对照组比较细胞凋亡率均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 以 400 $\mu\text{mol/L}$ 促凋亡能力最强 (Figure 2)。

2.3 Caspase3、Caspase9、Bcl-2、Bax mRNA 的表达

半定量 RT-PCR 结果, 以目的基因与内参基因 *GAPDH* 的荧光积分度比值表示目的基因的相对表达量。结果显示, *Caspase3*、*Caspase9* mRNA 的表达量随着 CK 浓度的增加显著增高, 与对照组相比, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bcl-2 mRNA 的

表达量随 CK 浓度的增加显著下降, 与对照组相比, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bax mRNA 的表达量无明显变化 (Table 2, Figure 3)。

2.4 Caspase3、Caspase9、Bcl-2、Bax 蛋白质的表达

Western Blot 分析结果与半定量 RT-PCR 结果相一致, *Caspase3*、*Caspase9* 蛋白表达量随 CK 浓度的增加均上调, 与对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。以 400 $\mu\text{mol/L}$ 处理蛋白质表达上

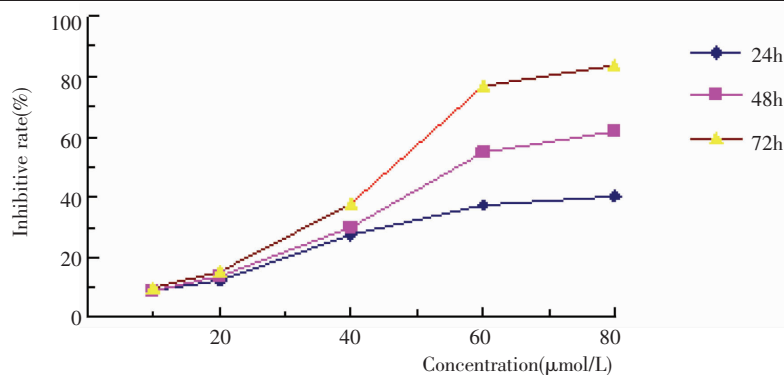


Figure 1 Inhibitive effect of CK on the growth of K562

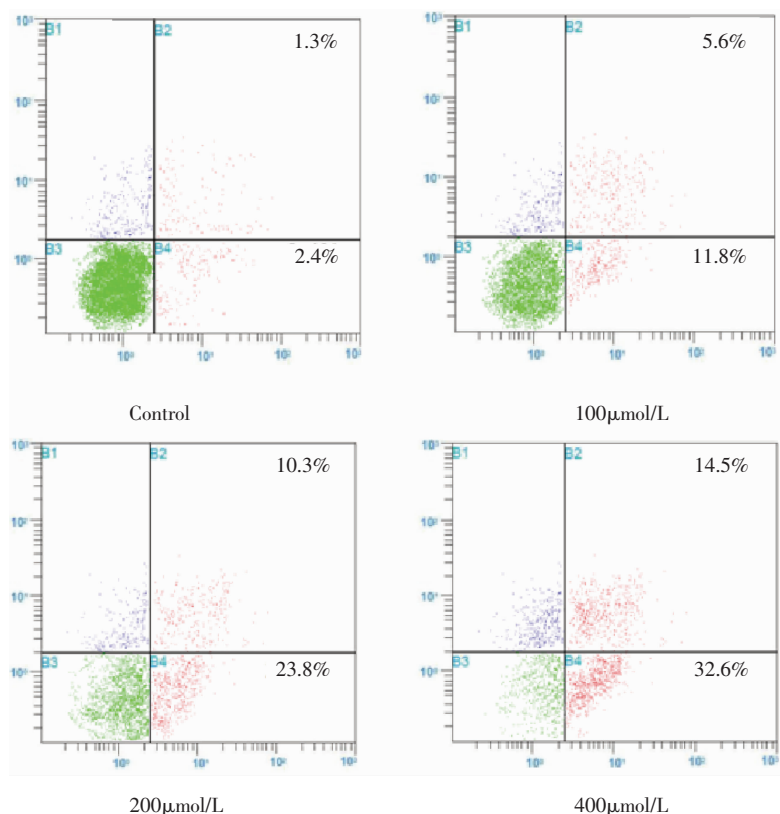


Figure 2 Flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining was used to determine the apoptotic effect of CK on K562 cells

Table 2 The RT-PCR analysis of *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* with CK on K562 cells

Gene	Concentration of CK($\mu\text{mol/L}$)			
	0	100	200	400
<i>Caspase3</i>	0.37 $\pm$ 0.027	0.58 $\pm$ 0.023*	0.62 $\pm$ 0.041*	0.69 $\pm$ 0.035*
<i>Caspase9</i>	0.41 $\pm$ 0.046	0.62 $\pm$ 0.053*	0.78 $\pm$ 0.018*	0.79 $\pm$ 0.049*
<i>Bax</i>	0.75 $\pm$ 0.056	0.77 $\pm$ 0.032	0.76 $\pm$ 0.061	0.75 $\pm$ 0.032
<i>Bcl-2</i>	0.73 $\pm$ 0.031	0.52 $\pm$ 0.028*	0.47 $\pm$ 0.031*	0.27 $\pm$ 0.019**

Note: vs control, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

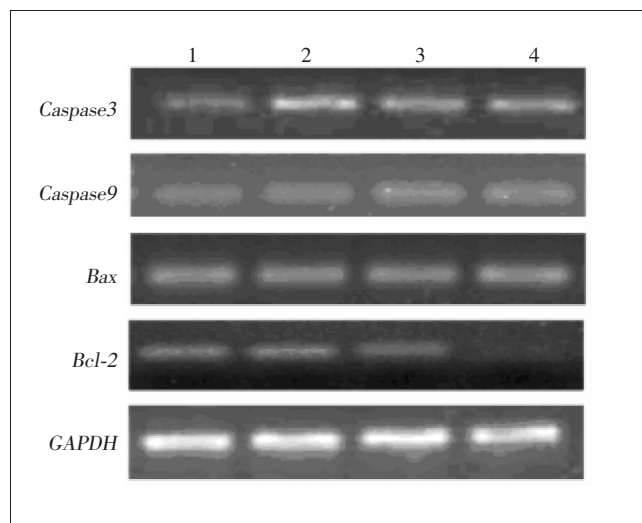


Figure 3 The RT-PCR analysis of *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* with CK on K562 cells

调最为显著。Bcl-2 蛋白的表达量随 CK 浓度的增加显著下降, 与对照组相比, 其差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。Bax 蛋白的表达亦无明显变化 (Table 3, Figure 4)。

3 讨论

目前认为, 肿瘤发生发展的分子机理是细胞分裂增殖和细胞凋亡紊乱的结果。因此, 寻找能够抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的药物将成为肿瘤治疗干预的重要手段之一。近 40 年来, 国内外学者试图

Table 3 The Western Blot analysis of *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* with CK on K562 cells

Protein	Concentration of CK($\mu\text{mol/L}$)			
	0	100	200	400
<i>Caspase3</i>	0.39 $\pm$ 0.017	0.53 $\pm$ 0.031*	0.61 $\pm$ 0.021*	0.72 $\pm$ 0.035**
<i>Caspase9</i>	0.34 $\pm$ 0.040	0.49 $\pm$ 0.047*	0.56 $\pm$ 0.008*	0.61 $\pm$ 0.049**
<i>Bax</i>	0.68 $\pm$ 0.021	0.72 $\pm$ 0.027	0.75 $\pm$ 0.031	0.73 $\pm$ 0.023
<i>Bcl-2</i>	0.45 $\pm$ 0.086	0.38 $\pm$ 0.027*	0.29 $\pm$ 0.061**	0.19 $\pm$ 0.024**

Note: vs control, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

从我国传统中草药中寻找抑制白血病等恶性肿瘤增殖或诱导其向成熟方向分化、凋亡的中药单体, 并取得了一定进展。研究发现, 人参皂苷 CK 是人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、Rd 等二醇型人参皂苷在人体肠道内的代谢产物, 是人参在体内发挥药理活性的实体^[1]。近年来诸多研究表明, CK 是二醇型人参皂苷在体内发挥活性的实体, 特别是在抗肿瘤、抗衰老、改善记忆、抗炎及保肝等方面都体现了良好的药效。

CK 的抗肿瘤活性研究表明, CK 能诱导细胞产生染色体凝集、细胞萎缩及 DNA 片断化等典型的凋亡症状。还可促进凋亡相关蛋白 p27kip1 的表达, 抑制肿瘤增殖蛋白 c-Myc 和 cyclin D1 的产生^[2]。CK 亦可促进线粒体细胞色素 c 释放到细胞质中, 导致 Caspase3 蛋白酶活性增加^[3], 诱导肿瘤细胞凋亡。进一步研究发现 CK 可诱导促凋亡蛋白 Bax 的表达增加, 促使肿瘤细胞的凋亡。人参皂苷 CK 对结直肠癌细胞 HCT-116 和 SW-480, 细胞阻滞是发生在分裂期的 G₁ 期并诱导其凋亡^[4,5]。CK 还能显著抑制成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3) 的表达, 同时抑制细胞外信号调节激酶(ERK) 的活性, 因此 CK 可成为临床上用于治疗 FGFR3 过表达的多发性骨髓瘤的候选化疗药物^[5]。Hu 等^[6]利用人胃癌细胞系 BGC823、SGC7901 发现细胞周期阻滞发生在细胞分裂期的 G₂ 期阶段。我们之前的研究^[7]发现 CK 能阻滞 K562 细胞于 G₂/M 期。可见, CK 显示良好的抗肿瘤活性, 诱导细胞凋亡的途径可能是多靶点、多方位的, CK 具有开发成抗肿瘤药的潜在价值。

本研究通过实验观察 CK 对 K562 的诱导凋亡

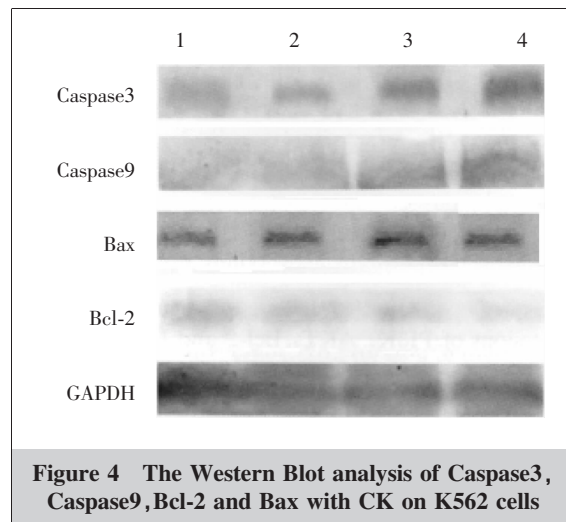


Figure 4 The Western Blot analysis of *Caspase3*, *Caspase9*, *Bcl-2* and *Bax* with CK on K562 cells

作用,发现 CK 能有效抑制 K562 细胞增殖,且抑制效应呈浓度依赖性。流式细胞结果显示,CK 能诱导 K562 细胞凋亡,各加药组细胞凋亡率明显高于对照组。进一步的 RT-PCR 和 Western Blot 实验结果显示,Caspase3 和 Caspase9 基因和蛋白的表达均上调,Bcl-2 的表达下调。

细胞凋亡是有多种基因调控主动的程序性死亡过程,是机体生长发育、细胞分化、生理及病理性死亡的重要机制。细胞凋亡的线粒体途径是指细胞应激反应和凋亡信号死亡受体途径传递到线粒体,引起细胞色素 C 释放,作为凋亡诱导因子,细胞色素 C 能与 Apaf-1、Caspase 前体、剪切并活化下游的 Caspase3、Caspase6、Caspase7 等效应分子,诱导细胞凋亡。Bcl-2 家族是线粒体途径凋亡过程中的重要调控因子,Bcl-2 作为抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白 Bax 共同调节细胞色素 C 的释放^[8],启动 Caspase 级联反应。

综上所述,CK 对 K562 细胞诱导凋亡的机制可能是 CK 作用使 Bcl-2 基因表达上调,激活 Caspase 信号途径,启动 Caspase 级联反应,活化线粒体凋亡途径,引起凋亡。

参考文献:

- [1] Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds[J]. J Korean Med Sci, 2007, 16(1): S28-S37.
- [2] Wakabayashi C, MuraKami K, Hasegawa H. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 246(3): 725-730.
- [3] Lee SJ, Ko WG, Kim JH, et al. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 60(5): 667-685.
- [4] Wang CZ, Du GJ, Zhang Z, et al. Ginsenoside compound K, not Rb1, possesses potential chemopreventive activities in human colorectal cancer [J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 1970-1976.
- [5] Park S, Lee HJ, Jeong SJ, et al. Inhibition of JAK1/STAT3 signaling mediates compound K-induced apoptosis in human multiple myeloma U266 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(6): 1367-1372.
- [6] Hu C, Song G, Zhang B, et al. Intestinal metabolite compound K of panaxoside inhibits the growth of gastric carcinoma by augmenting apoptosis via Bid-mediated mitochondrial pathway [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(1): 96-106.
- [7] Chuan-ming JIANG, He Shao-bo, Zhou Yu, et al. Effect of ginsenoside compound K on the proliferation and apoptosis in K562 cells [J]. Central South Pharmacy February, 2013, 11(2): 102-105.
- [8] Yin XM. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas / TNF-R1 death receptors in hepatocytes [J]. J Mol Med (Berl), 2011, 78(4): 203-211.