

文章编号:1000-5404(2012)12-1181-04

论著

人参多糖对 K562 细胞凋亡与细胞周期的影响及其机制

刘 艺,陈地龙,何 轩,姜 蓉,王建伟,左国伟,魏 强,赵 亮,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 探讨人参多糖(ginseng polysaccharide, GPS)诱导白血病细胞 K562 凋亡和周期阻滞的机制。方法 取对数生长期的 K562 细胞,调整密度为 $7 \times 10^8/L$,空白对照组予以常规培养;GPS 组加入 400 mg/L GPS。流式细胞仪测定细胞的凋亡率及细胞周期分布变化;RT-PCR 检测细胞 ERK 表达的变化。免疫组化的方法检测细胞中 p-ERK、NF- κ B、Cyclin D₁ 蛋白定位及表达量的变化。Western blot 检测细胞中 ERK、p-ERK、NF- κ B、Cyclin D₁ 蛋白的变化。结果 与对照组比较,K562 细胞在 400 mg/L GPS 的作用下,体外培养 24、48、72 h 后,GPS 组细胞凋亡率显著增高($P < 0.05$),周期分布检测结果显示,与对照组相比,GPS 组 K562 细胞 G₀/G₁ 期细胞数量呈时间依赖性增多($P < 0.05$),G₂ + M、S 期细胞数量则明显减少($P < 0.05$)。RT-PCR 检测结果显示,400 mg/L GPS 处理 48 h 组 ERK mRNA 的表达水平明显低于对照组(0.20 vs 0.50, $P < 0.05$)。免疫组化显示 p-ERK、NF- κ B、Cyclin D₁ 主要分布在细胞核和细胞质,与对照组相比,GPS 组 K562 细胞内 p-ERK、NF- κ B、Cyclin D₁ 的表达明显减弱。Western blot 检测结果显示,ERK 总蛋白无明显变化($P > 0.05$),而 p-ERK、NF- κ B、Cyclin D₁ 随时间变化有减少趋势,且在 48 h 减少明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 人参多糖 GPS 可促使 K562 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,并诱导 K562 细胞凋亡,且均呈时间依赖性。GPS 促进 K562 细胞凋亡、导致其细胞周期阻滞的机制可能是通过抑制 ERK/NF- κ B 信号通路的激活,进而下调 Cyclin D₁ 来实现的。

[关键词] 人参多糖;K562 细胞;周期阻滞;ERK;NF- κ B;Cyclin D₁

[中图分类号] R285.5;R730.23;R733.7

[文献标志码] A

Mechanism of ginseng polysaccharide on apoptosis and cell cycle in leukemia K562 cells

Liu Yi, Chen Dilong, He Xuan, Jiang Rong, Wang Jianwei, Zuo Guowei, Wei Qiang, Zhao Liang, 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 investigate the mechanism of ginseng polysaccharide (GPS) on the cell cycle and apoptosis in leukemia K562 cells. **Methods** Leukemia K562 cells in logarithmic phase with density of $7 \times 10^8 L^{-1}$ were incubated with (GPS group) and without (control group) 400 mg/L GPS, respectively. The effects of GPS on K562 cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry (FCM). The mRNA expression of ERK was detected by RT-PCR. The distributions and protein expressions of ERK, p-ERK, NF- κ B and cyclin D₁ were detected by immunohistochemical staining and Western blotting. **Results** Compared with the control group, the apoptosis rate of the K562 cells in the GPS group significantly increased after treatment for 24, 48 and 72 h ($P < 0.05$). The number of the K562 cells arrested in G₀/G₁ phase increased significantly in a time-dependent manner in the GPS group ($P < 0.05$), and that of the K562 cells in G₂ + M and S phases decreased significantly ($P < 0.05$). The mRNA level of ERK after 48 h treatment was significantly lower in the GPS group than in the control group (0.20 vs 0.50, $P < 0.05$). The immunohistochemical staining results showed that p-ERK, NF- κ B and cyclin D₁ mainly located in the nucleus and cytoplasm, and the expressions of the three proteins significantly decreased in the GPS group compared with those in the control group. The Western blotting results showed that there as no significant change in total ERK ($P > 0.05$), but the differences of p-ERK, NF- κ B and cyclin D₁ were statistically significant between the GPS group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** GPS can induce cell cycle arrest in G₀/G₁ phase and cell apoptosis of K562 cells in a

[基金项目] 国家自然科学基金(30873406);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5075)

[通信作者] 李 静,电话:(023)68485626, E-mail:lijingyangyang@126.com

time-dependent manner, probably through inhibiting ERK/NF-κB signaling pathway and thus reducing cyclin D₁ expression.

[Key words] ginseng polysaccharide; K562 cells; cell cycle arrest; ERK; NF-κB; Cyclin D₁

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30873406) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5075). Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68485626, E-mail: lijingyangyang@126.com

人参是中医临床“补气要药”,有“补气生血”之功效,人参多糖(ginseng polysaccharide, GPS)是其主要药用成分之一。我室既往的研究^[1]表明, GPS 可以抑制 K562 细胞的增殖、诱导其向成熟方向分化并诱导 K562 细胞凋亡,但其抗白血病作用的机制仍不清楚。本课题组前期应用 Illumina 全基因组表达谱基因芯片对人 GPS 作用前后 K562 细胞的基因表达差异进行检测,发现 GPS 可以影响 T 细胞受体信号通路而对 K562 细胞产生促进凋亡和诱导分化的作用^[2]。在该通路中有丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节蛋白激酶(MAPK/ERK)信号通路及其下游通路的参与,因此这引起了我们的关注。本研究拟观察经 GPS 作用后 K562 细胞凋亡率和周期的变化及 ERK、磷酸化 ERK(p-ERK)、核转录因子(NF-κB)及其下游细胞周期调控因子细胞周期素(Cyclin D₁)表达的变化,旨在探讨 GPS 引起 K562 细胞周期阻滞诱导其凋亡的机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药品 人参多糖注射液为山西普德药业有限公司生产(主要成分:人参多糖,批号:20071201,剂量:3 mg/ml),以 RPMI1640 培养液配制所需浓度,滤过除菌。人红白血病细胞株(K562 细胞)为本校检验系血液学实验室惠赠,K562 细胞以 7 × 10⁸/L 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。

1.1.2 试剂 RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季清公司),6 孔培养板(美国 Falcon Plastics 公司),RIPA 蛋白裂解液(江苏碧云天生物技术研究所)兔抗人 ERK、phospho-ERK(Santa Cruz 公司),兔抗人 Cyclin D₁、NF-κB p65(Epitomics 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 流式细胞术测定细胞凋亡和周期 取对数生长期的 K562 细胞接种于 6 孔板中,接种体系 5 ml,调整密度为 1 × 10⁵/ml,分为 2 组:①对照组:常规培养,并加入与 GPS 等量 RPMI1640;②GPS 组:培养体系中加入 GPS(终浓度分别为 400 mg/L)。培养 48 h 后,收集对照组及各浓度药物组所有悬浮细胞,调整细胞密度为 1 × 10⁵/ml,取 1 ml 细胞,离心后加 RNA 酶处理,加碘化乙锭(PI)或联合 Annexin V,然后上流式细胞仪检测。采用 CellQuest 软件分析细胞凋亡和细胞周期。

1.2.2 免疫细胞化学检测 GPS 诱导后白血病细胞 p-ERK、NF-κB、Cyclin D₁ 的表达 取对照组和经 400 mg/L GPS 诱导 48 h 的 K562 细胞,经 PBS 洗涤后离心甩片,以人抗小鼠

p-ERK、单克隆抗体和人抗兔 NF-κB、Cyclin D₁ 单克隆抗体进行免疫细胞化学 S-P 法染色。

1.2.3 RT-PCR 检测 GPS 处理 K562 细胞前后 ERK 基因表达

对照组和 GPS 组各设 3 个复孔,在培养第 2 天取样,Trizol 法提取 RNA,RT-PCR 检测 K562 细胞中 ERK 表达。PCR 引物序列:ERK 正义链 5'-CCCAAATGCTGACTCCAAAG-3';反义链 5'-TCGGGTCTGAATACTGCTCC-3',产物长度 122 bp。GAPDH 正义链 5'-ACAGCCTCAAGATCATCAGCA-3',反义链 5'-TGAGT-CCTTCCACGATACCAA-3',产物长度 99 bp。PCR 反应步骤:94 °C 5 min 解链后,94 °C 30 s,退火温度 58 °C 30 s,72 °C 延长 20 s,循环 34 次,内参 28 次,72 °C 延长 10 min。

1.2.4 Western blot 检测 GPS 诱导后白血病细胞 ERK、p-ERK、NF-κB、Cyclin D₁ 的表达 分别在培养第 6、18、24、48、72 小时收集对照组和 GPS 组 K562 细胞。收集各处理组 K562 细胞,PBS 洗涤 2 次,用 RIPA 裂解液,提取细胞总蛋白,4 °C,12 000 × g 离心 5 min 后取上清。蛋白浓度测定按试剂说明操作,测 D(570) 值。以牛血清白蛋白为标准样品绘制标准曲线。取 40 μg 待测蛋白质样品,行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入一抗,4 °C 过夜;以 TBST 漂洗后,加入二抗,常温作用 1 h,再经 TBST 漂洗,最后用显色剂 ECL 试剂盒(碧云天公司)显色、曝光 Photoshop 6.0 软件分析结果。

1.3 统 计 学 分 析

采用 SPSS 13.0 统计软件,多组间比较行单因素方差分析,两两比较行 t 检验。

2 结 果

2.1 GPS 诱导 K562 细胞凋亡的作用结果

与对照组比较,体外培养分别培养 24、48、72 h 后 400 mg/L GPS 组 K562 细胞的凋亡率明显增加(P < 0.05),呈时间依赖性,见表 1,提示 GPS 作用 K562 细胞后可诱导其凋亡,且该作用呈时间依赖性。

表 1 GPS 对 K562 细胞凋亡率的影响(%, n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率	死亡率
对照组	3.82 ± 0.23	1.74 ± 0.17
GPS 组		
24 h	23.00 ± 0.65 ^a	7.73 ± 0.34 ^a
48 h	43.85 ± 0.87 ^a	12.63 ± 0.67 ^a
72 h	49.56 ± 0.93 ^a	13.70 ± 0.48 ^a

a: P < 0.05, 与对照组比较

2.2 GPS 对 K562 细胞周期的影响

与对照组比较,体外培养分别培养 24、48、72 h 后 400 mg/L GPS 组 K562 细胞周期 G₀/G₁ 期,细胞数量明显增多(P < 0.05),G₂ + M、S 期细胞数量明显减少(P < 0.05)呈时间依赖

性(表2),此结果提示GPS作用K562细胞后可使其细胞周期阻滞在G₀/G₁期。

表2 GPS对K562细胞周期的影响(% , n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁	G ₂ +M	S
对照组	42.51 ± 1.13	6.63 ± 0.45	50.80 ± 1.16
GPS组			
24 h	53.51 ± 1.02 ^a	9.35 ± 0.51	37.14 ± 0.99 ^a
48 h	60.32 ± 1.15 ^a	7.21 ± 0.38	32.47 ± 0.78 ^a
72 h	70.42 ± 1.22 ^a	3.00 ± 0.27 ^a	26.58 ± 0.86 ^a

a: P < 0.05, 与对照组比较

2.3 GPS诱导后白血病细胞p-ERK、NF-κB、Cyclin D₁的表达

免疫组化显示:对照组p-ERK蛋白在细胞核、细胞质均有表达,尤其细胞核表达较强,经GPS作用细胞48 h后,p-ERK在细胞质中的表达量减少,而在细胞核中的表达量更是明显减少,且蛋白总量降低明显(图1)。对照组NF-κB蛋白主要定位在细胞核和细胞质,经GPS作用细胞48 h后,NF-κB蛋白表达在细胞核中明显减弱,且蛋白总量降低明显(图2)。对照组Cyclin D₁主要定位在细胞核、细胞质,GPS作用48 h后,蛋白的表达明显减弱(图3)。

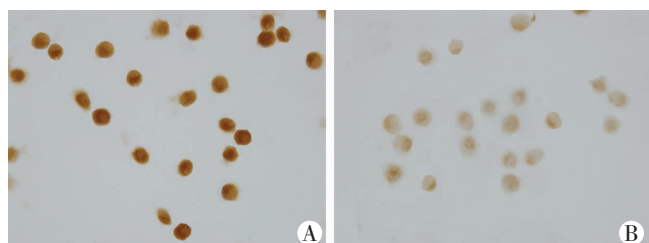


图1 对照组(A)和GPS组(B)K562细胞中p-ERK蛋白表达的变化(S-P × 1 000)

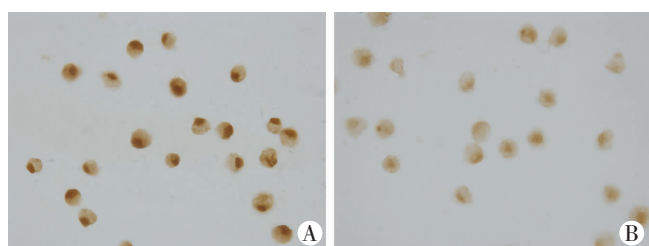


图2 对照组(A)和GPS组(B)K562细胞中NF-κB蛋白表达的变化(S-P × 1 000)

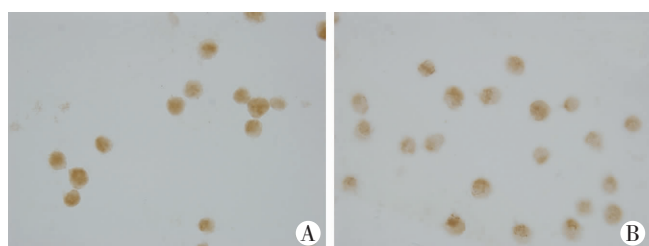


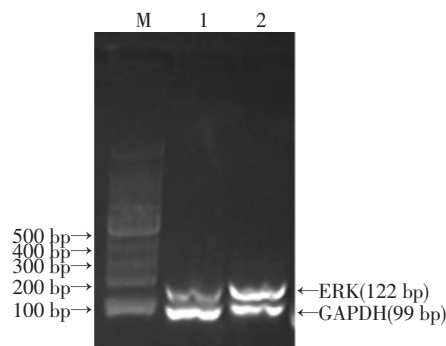
图3 对照组(A)和GPS组(B)K562细胞中Cyclin D₁蛋白表达的变化(S-P × 1 000)

2.4 GPS对K562细胞ERK mRNA和ERK、p-ERK、NF-κB及Cyclin D₁蛋白表达的影响

RT-PCR检测结果显示,400 mg/L GPS处理48 h组ERK

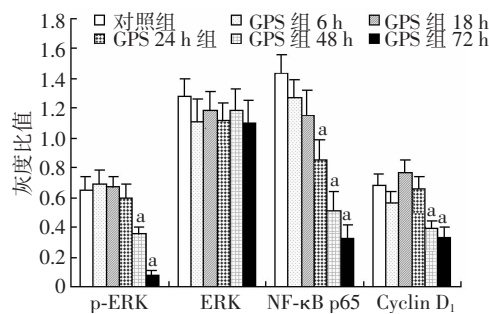
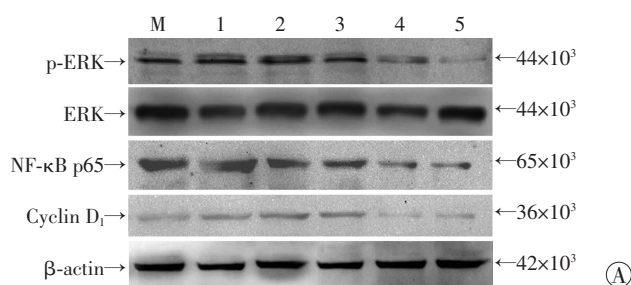
mRNA的表达水平明显低于对照组(0.20 vs 0.50, P < 0.05)。见图4。

Western blot检测结果显示,GPS 400 mg/L分别作用K562细胞6、18、24、48、72 h后,ERK总蛋白无明显变化;p-ERK、Cyclin D₁、NF-κB随时间变化有减少趋势,且在48 h减少明显(图5)。



M: 标准; 1: GPS组; 2: 对照组

图4 RT-PCR检测GPS处理48 h ERK mRNA的表达变化



A: Western blot 检测结果 1: 对照组; 2: GPS组 6 h; 3: GPS组 18 h; 4: GPS组 24 h; 5: GPS组 48 h; 6: GPS组 72 h; B: 半定量分析结果 a: P < 0.05, 与对照组比较

图5 Western blot检测ERK、p-ERK、NF-κB、Cyclin D₁蛋白的表达

3 讨论

白血病是严重危害人类生命健康的造血系统肿瘤。迄今,白血病的治疗仍主要采用传统大剂量联合化疗,但此法副作用大、复发率高,对机体免疫与造血功能损害极大,因此寻找高效低毒的药物成为白血病治疗的希望。课题组前期证实人参多糖有诱导白血病向成熟方向分化和促进凋亡的双向调节作用^[1],但其具体机制尚不清楚。

MAPK家族成员ERK介导的通路在维系细胞生

存中起重要作用。当细胞受到外界刺激后,可通过激活 ERK 激酶 1 (MEK),进而使 ERK 磷酸化活化,使之由细胞质转位到核内,参与细胞多种生物学反应。近年来,围绕肿瘤、血液等领域的研究表明,ERK 信号通路是多数生长因子和细胞因子调控细胞增殖的重要途径^[3-5],若其持续活化则最终可使细胞发生恶性转化。有研究表明 K562 细胞系抗凋亡特性就与 ERK 基础活性较高有关,ERK 活性受抑后,可使 K562 发生凋亡^[6]。本研究中,GPS 作用 K562 细胞后,p-ERK 呈时间依赖性降低,因此 p-ERK 活化降低可能是 GPS 诱导 K562 凋亡的原因之一。

NF- κ B 作为众多基因转录调节因子,通过与其他转录因子的协同作用,在转录水平上形成复杂的基因调控网络,产生抗凋亡、促增殖、促转移的作用^[7]。正常情况下 NF- κ B 在细胞质内与抑制性蛋白(I- κ B 或 Bel-3)等结合,以无活性状态存在于细胞质中,当有刺激因子如肿瘤坏死因子、放射线、病毒和细菌等作用时,可激活 κ B 抑制蛋白激酶(IKK),促进 I- κ B 降解,释放后 NF- κ B 转位进入细胞核,能促进具有细胞保护和抗凋亡作用的基因转录和表达,从而发挥抗凋亡、促进细胞生长的作用。有研究表明,当 ERK 磷酸化,可促进 IKK 磷酸化,进而促进 NF- κ B 的活化,此称 ERK-IKKs-I κ B-NF- κ B 信号级联反应^[8-9]。本研究中,GPS 作用 K562 细胞后,p-ERK、NF- κ B 均呈时间依赖性降低,这提示 GPS 可能是通过抑制 ERK/NF- κ B 信号通路来诱导 K562 凋亡的。

Cyclin D₁为细胞周期相关癌基因,它通过细胞周期相关蛋白 Rb 的灭活作用,促使细胞从 G₁期顺利进入 S 期,完成 DNA 复制。Cyclin D₁的过度表达可使细胞持续增殖并可能导致恶性转化。人类的多种恶性肿瘤中发现有 Cyclin D₁过度表达。有研究证实,ERK 阻滞剂通过 ERK 通路抑制 MEK 激酶(MEK Kinase, MEKK)活性,从而抑制 MAPKs 级联反应参与细胞周期调控,尤其是 G₁/S 期调节^[10-11]。Cyclin D₁的转录依赖于 ERK 的持续激活和核内的滞留^[12]。也有研究发现 Cyclin D₁、p53 等均为 NF- κ B 的下游靶基因,NF- κ B 通过调节 Cyclin D₁、p53 等的表达,而导致细胞周期调节失控,从而导致肿瘤细胞的增殖^[13]。Cyclin D₁启动子含有两个 NF- κ B 结合点,NF- κ B 活化具有促进 Cyclin D₁表达及 G₁/S 期转换的功能,使正性生长信号的持续刺激或程序性死亡受阻,正常细胞发生恶性转化^[14]。本研究中,我们发现用 GPS 处理 K562 细胞后,Cyclin D₁呈时间依赖性降低,与 p-ERK、NF- κ B 蛋白表达水平呈正相关,因此我们推测 GPS 使 K562 凋亡可能通过抑制 ERK/NF- κ B 介导的信号转导途径来抑制细

胞增殖周期重要正性调节因子 Cyclin D₁的表达,细胞周期停滞在 G₀/G₁,最终诱导 K562 细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 何轩,姜蓉,李静,等. 人參多糖注射液体外诱导人白血病细胞株 K562 增殖抑制及分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(49): 9225 - 9229.
- [2] 李建平,何轩,姜蓉,等. 人參多糖对 K562 细胞基因表达谱的影响[J]. 中草药, 2011, 42(5): 940 - 943.
- [3] 王树森,管忠震,向燕群,等. 鼻咽癌组织中 EGFR 和 p-ERK 蛋白表达的检测及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(1): 28 - 31.
- [4] 樊华,杜宏,张国君,等. VEGF 和 N-Ras 及 pERK1/2 在急性髓系白血病骨髓中的表达及相关性研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(12): 903 - 906.
- [5] Vicent S, Lopez-Picazo J M, Toledo G, et al. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours[J]. Br J Cancer, 2004, 90(5): 1047 - 1052.
- [6] Kang C D, Yoo S D, Hwang B W, et al. The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells[J]. Leuk Res, 2000, 24(6): 527 - 534.
- [7] 肖青,唐宗山,黄宗干,等. 昆布多糖硫酸酯对急性髓性白血病 HL-60 细胞株 NF- κ B 表达的实验研究及 CD11b 在 HL-60 细胞株的表达[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(24): 47 - 49.
- [8] Wu C J, Wang Y H, Lin C J, et al. Tetrandrine down-regulates ERK/NF- κ B signaling and inhibits activation of mesangial cells [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(8): 1834 - 1840.
- [9] Dia V P, Gonzalez-de-Mejia E. Lunasin potentiates the effect of oxaliplatin preventing outgrowth of colon cancer metastasis, binds to α 5 β 1 integrin and suppresses FAK/ERK/NF- κ B signaling[J]. Cancer Lett, 2011, 313(2): 167 - 180.
- [10] Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, et al. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated; up-regulation of P27 (Kip1) [J]. J Biol Chem, 2001, 276(4): 2686 - 2692.
- [11] Kortylewski M, Heinrich P C, Kauffmann M E, et al. Mitogen-activated protein kinases control P27/Kip1 expression and growth of human melanoma cells[J]. Biochem J, 2001, 357(Pt 1): 297 - 303.
- [12] Ravenhall C, Cuida E, Harris T, et al. The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle[J]. Br J Pharmacol, 2000, 131(1): 17 - 28.
- [13] Harlozinska A, Bar J, Montenarh M. Analysis of the immunoreactivity of three anti-P53 antibodies and estimation of the relations between P53 status and MDM2 protein expression in ovarian carcinomas[J]. Anticancer Res, 2000, 20(2A): 1049 - 1056.
- [14] Manna S K, Aggarwal B B. All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells [J]. Oncogene, 2000, 19(17): 2110 - 2119.

(收稿:2011-11-11;修回:2011-12-11)

(编辑 吴培红)