

人参皂甙对人白血病-60 细胞凋亡的影响

刘笑梦¹ 曹姣玲¹ 臧玉柱²

(1. 洛阳职业技术学院, 河南 洛阳 471000; 2. 河南省人民医院血液病研究所, 河南 郑州 450003)

〔摘要〕 目的 探讨人参皂甙对白血病细胞的致凋亡作用及其相关作用机制。方法 采用 MTT 细胞毒实验检测不同浓度(100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 μmol/L)人参皂甙对人白血病-60(HL-60)细胞的生长抑制活性;流式细胞术 Annexin V/PI 双染法检测不同浓度(0、5、10、20 μmol/L)人参皂甙诱导 HL-60 细胞凋亡情况;提取各种浓度人参皂甙处理的细胞总蛋白,Western blot 检测 caspase-8、caspase-9 和 caspase-3 裂解情况;Western blot 检测 10 μmol/L 人参皂甙处理 HL-60 细胞后 caspase-8 和 caspase-9 抑制剂对 caspase-3 裂解情况的影响。结果 人参皂甙对白血病 HL-60 细胞具有高效的细胞毒作用,IC₅₀ 值为 7.3 ± 1.2 μmol/L;0、5、10、20 μmol/L 人参皂甙处理 HL-60 细胞 48 h 后,流式细胞仪检测细胞的凋亡率呈剂量依赖性,各处理组之间差异有统计学意义($F = 12.67, P < 0.01$);Western blot 检测细胞中 caspase-9 和 caspase-3 出现裂解带,而 caspase-8 未出现裂解带;10 μmol/L 人参皂甙诱导 caspase-3 裂解可以被 caspase-9 的特异性抑制剂 Z-LEHD-FMK 所抑制,而 caspase-8 的特异性抑制剂 Z-IETD-FMK 却没有这一作用。结论 人参皂甙对人白血病 HL-60 细胞具有高效的致凋亡作用,激活线粒体凋亡途径可能是其致凋亡的主要作用机制。
[中国当代儿科杂志,2012,14(10):792-795]

〔关键词〕 人参皂甙;细胞凋亡;线粒体通路;人白血病-60 细胞
〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2012)10-0792-04

Effect of ginsenoside on apoptosis of human leukemia-60 cells

LIU Xiao-Meng, CAO Jiao-Ling, ZANG Yu-Zhu. Luoyang Vocational & Technical College, Luoyang, Henan 471000, China (Zang Y-Z, Email: zhangyuzhu@medmail.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of ginsenoside on apoptosis of human leukemia-60 (HL-60) cells and its mechanism. **Methods** MTT cytotoxicity assay was used to determine the growth inhibition activity of ginsenoside (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.5625 μmol/L) on HL-60 cells. The apoptosis of HL-60 cells after treatment with ginsenoside (0, 5, 10 and 20 μmol/L) was determined by Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry. The cleavage of total proteins by caspase-8, caspase-9 and caspase-3 was evaluated by Western blot. The cleavage of caspase-3 protein was detected by Western blot after treatment with 10 μmol/L ginsenoside and caspase-8 and 9 inhibitors. **Results** Ginsenoside had potent cytotoxicity on HL-60 cells, with an IC₅₀ value of 7.3 ± 1.2 μmol/L. After treatment with ginsenoside (0, 5, 10 and 20 μmol/L) for 48 hours, the apoptotic rate displayed a dose dependency, as shown by flow cytometry, with significant differences between the groups ($F = 12.67, P < 0.01$). Western blot showed that there were caspase-9 and caspase-3 cleavage bands, but without caspase-8 cleavage band. The specific inhibitor of caspase-9 Z-LEHD-FMK could block the caspase-3 cleavage induced by 10 μmol/L ginsenoside, but the specific inhibitor of caspase-8 Z-IETD-FMK did not have this effect. **Conclusions** Ginsenoside can induce apoptosis of HL-60 cells, which may be related to a mitochondria-dependent pathway.
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(10):792-795]

Key words: Ginsenoside; Apoptosis; Mitochondria-dependent pathway; Human leukemia-60 cell

肿瘤严重威胁着人类的健康和生命,已成为继心血管病之后人类第二大致死原因。白血病人群发病率不高,约占所有肿瘤的3%,但白血病却占到儿童肿瘤的40%以上,并且近年来因为环境污染和不良装饰材料的使用,白血病的发病率有逐年增加的趋势^[1-2]。化疗是白血病的主要治疗方法,但多药耐药的产生常常会导致化疗失败,寻找新的抗肿瘤药物是克服肿瘤多药耐药的一个有效方法^[3]。人参皂甙是近年来从人参中分离出的主要有效单体成分之一,已有研究显示其可以通过致凋亡、抑制细胞的黏附、浸润和转移、抑制血管形成和肿瘤的淋巴道转移等多个方面发挥抗肿瘤作用^[4-5]。本研究使用人

〔收稿日期〕2012-04-22;〔修回日期〕2012-06-01
〔作者简介〕刘笑梦,女,本科,副教授。
〔通信作者〕臧玉柱,副主任医师。

白血病-60(HL-60)细胞观察人参皂甙对白血病的致凋亡作用,并探讨其相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

HL-60 细胞由中国医学科学院血液学研究所提供,链霉素、青霉素、MTT、人参皂甙为美国 Sigma 公司产品,Z-IETD-FMK(caspase-8 抑制剂)、Z-LEHD-FMK(caspase-9 抑制剂)购自杭州联科生物技术有限公司,胎牛血清购于杭州四季青公司,PRMI1640 培养基购自广州英韦创津公司,Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒为南京凯基生物科技有限公司产品,caspase-3、caspase-8、caspase-9、GAPDH 抗体和 IgG-HRP 二抗为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.2 细胞培养

HL-60 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素及链霉素的 PRMI 1640 培养液中。

1.3 MTT 细胞毒实验

HL-60 细胞接种于 96 孔板中,依次加入 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 μmol/L 的人参皂甙,每个浓度 3 个复孔,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 68 h 后,每孔加入 20 μL MTT 反应 4 h,弃去培养液,加入 DMSO 100 μL 溶解结晶,酶标仪 570 nm 波长测定 OD 值,计算半数生长抑制浓度(IC₅₀值),实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

用 0、5、10、20 μmol/L 的人参皂甙处理 HL-60 细胞 48 h,收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次,按照试剂盒说明书加入 PI 和 Annexin V-FITC,染色 30 min,流式细胞仪检测分析细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测

1 × SDS 上样缓冲液裂解 0、5、10、20 μmol/L 人参皂甙处理的 HL-60 细胞以提取细胞总蛋白,8% ~ 12% SDS-PAGE 电泳,转移蛋白至 PVDF 膜,将 PVDF 膜浸润在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中 1 h,加入特异性一抗 4℃ 过夜,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,最后加入发光底物经 X 线曝光显示目的蛋白条带,实验重复 3 次。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂甙对人白血病 HL-60 细胞的致凋亡作用

MTT 结果显示人参皂甙对人白血病 HL-60 细胞具有高效的生长抑制作用,半数抑制浓度(IC₅₀)值为 7.3 ± 1.2 μmol/L。流式结果显示 0、5、10、20 μmol/L 的人参皂甙处理 HL-60 细胞 48 h 后细胞的凋亡率分别为(1.5 ± 1.0)%、(5.4 ± 1.8)%、(14.8 ± 3.7)%、(28.9 ± 6.5)%,均显著高于对照组(*P* < 0.05 或 0.01);各处理组间差异亦有统计学意义(*P* < 0.01),提示人参皂甙诱导 HL-60 细胞凋亡呈剂量依赖性。见图 1 ~ 2。

2.2 人参皂甙对人白血病 HL-60 细胞凋亡通路的影响

0、5、10、20 μmol/L 的人参皂甙处理 HL-60 细胞 48 h 后,Western blot 检测到了 caspase-9 和 caspase-3 的裂解带,而没有检测到 caspase-8 的裂解带(图 3),提示人参皂甙通过激活 caspase-9 而促进 caspase-3 的剪切,进而诱发了 HL-60 细胞的凋亡。

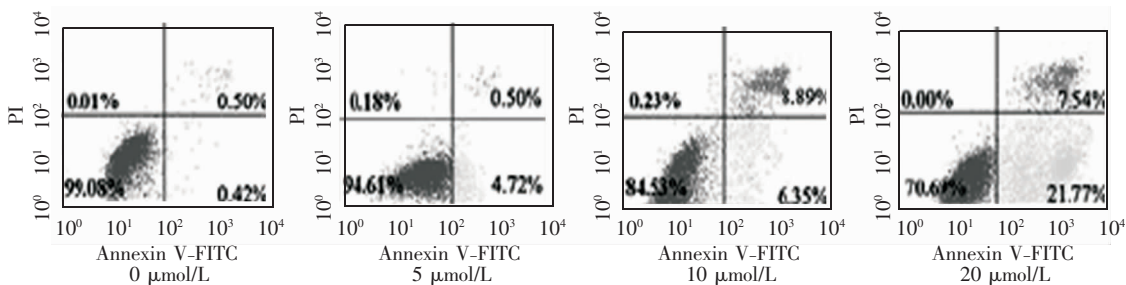


图 1 流式细胞仪检测不同浓度人参皂甙对 HL-60 细胞致凋亡作用

2.3 Caspase-9 抑制剂对人参皂甙促进 HL-60 细胞凋亡的影响

为了进一步观察人参皂甙对 HL-60 细胞凋亡通路的影响,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂甙处理 HL-60 细胞前,分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ Z-IETD-FMK 和 Z-LEHD-FMK,结果显示 Z-LEHD-FMK 抑制了人参皂甙诱导的 caspase-3 剪切,再次证实人参皂甙通过 caspase-9 途径促进 HL-60 细胞凋亡。见图 4。

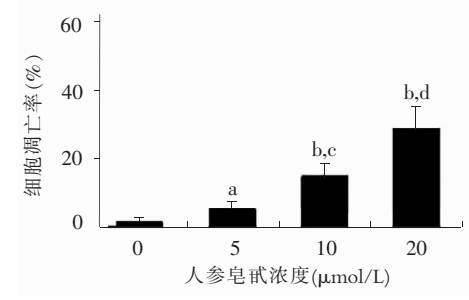


图2 不同浓度人参皂甙对 HL-60 细胞致凋亡作用($n=3$) a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与对照组比较, $P<0.01$;c:与 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.01$;d:与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P<0.01$ 。

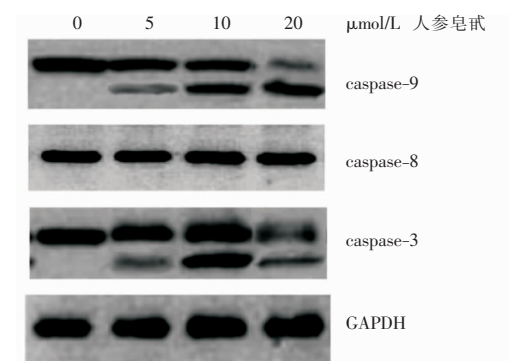


图3 Western blot 检测人参皂甙对 HL-60 细胞凋亡通路的作用 人参皂甙诱导了 caspase-9 和 caspase-3 的裂解,并不能诱导 caspase-8 裂解。

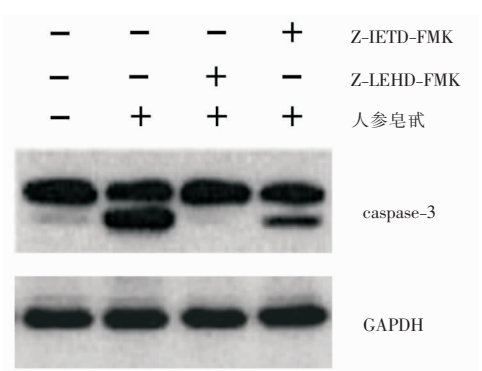


图4 Caspase-9 抑制剂对人参皂甙促进 HL-60 细胞凋亡的影响 Caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK 可以抑制人参皂甙诱导 caspase-3 的裂解,但 caspase-8 抑制剂 Z-IETD-FMK 不能抑制人参皂甙诱导 caspase-3 的裂解。“+”表示应用此剂,“-”表示未用此剂。

3 讨论

中药人参在我国已经有近 2000 年的使用历史,在一些慢性病的治疗方面取得了很好的疗效。人参皂甙是人参的主要活性成分,对人体新陈代谢、内分泌、免疫、心血管和神经等系统均有作用,人参皂甙对肿瘤细胞的作用近年已成为研究的热点^[6]。药物抗肿瘤的作用主要是诱导了细胞的凋亡,细胞凋亡的检测方法有多种,其中流式细胞术 Annexin V/PI 双染法是一种特异性高、敏感性高、可定量的检测方法,其原理是凋亡细胞膜通透性增高,细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸可游离到细胞外,与 Annexin V 结合,同时 PI 可以进入细胞内使 DNA 染色^[7]。本研究中采用这一方法检测到人参皂甙诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡呈剂量依赖性,提示人参皂甙具有诱导白血病细胞凋亡的活性。

细胞凋亡主要是通过线粒体和死亡受体途径进行调控,caspase-3 是两条途径的最终作用蛋白,死亡受体途径通过活化 caspase-8 而线粒体途径通过活化 caspase-9 来激活 caspase-3,水解或灭活一些细胞关键蛋白,从而促使细胞凋亡^[8]。线粒体途径是细胞在某些刺激下,例如活性氧等,形成凋亡诱导线粒体膜通道 (mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC),MAC 形成后线粒体中的细胞色素 C (Cyto-c) 就释放入胞浆,胞浆中的 Cyto-c 很快与凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apaf-1)、ATP 和 caspase-9 形成复合物,在此聚合体中 Apaf-1 可以剪切 caspase-9,进而活化 caspase-9 去剪切 caspase-3,产生一系列的级联反应,引起细胞的凋亡^[9-10]。本研究显示人参皂甙可以诱发 HL-60 细胞 caspase-9 和 caspase-3 裂解带的产生,而不能诱发 caspase-8 的裂解,提示人参皂甙是通过激活 caspase-9 来诱导 HL-60 细胞凋亡;另外本研究在使用人参皂甙基础上加用 caspase-9 的特异性抑制剂,结果显示 caspase-3 裂解带消失,而加入 caspase-8 的特异性抑制剂却没有观察到这个现象,进一步说明了人参皂甙是通过线粒体途径诱发了 HL-60 细胞的凋亡。

综上所述,本研究显示人参皂甙对人白血病细胞具有高效的致凋亡作用,激活线粒体凋亡途径是其致凋亡的主要作用机制。

[参 考 文 献]

[1] Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011;

the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212-236.

[2] 陈万青, 张思维, 孔灵芝, 雷正龙, 赵平. 中国肿瘤登记处2004年恶性肿瘤死亡资料分析[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(11): 71-96.

[3] Chen ZS, Tiwari AK. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases[J]. FEBS J, 2011, 278(18): 3226-3245.

[4] Li L, Sheng YX, Zhang JL, Wang SS, Guo DA. High-performance liquid chromatographic assay for the active saponins from Panax notoginseng in rat tissues[J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(4): 327-335.

[5] 王鸿彪. 人参皂甙 R93 抗肿瘤作用研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(3): 323-326.

[6] 安宁, 朱文. 人参皂苷 R93 抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 现代肿瘤学, 2008, 16(4): 648-652.

[7] 佟俊杰, 张广耘, 袁晓. 细胞凋亡检测方法的研究进展[J]. 口腔医学, 2010, 30(7): 437-439.

[8] Strasser A, O' Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 217-245.

[9] Wu YF, Liang XJ, Liu YY, Gong W, Liu JX, Wang XP, et al. Antisense oligonucleotide targeting survivin inhibits growth by inducing apoptosis in human osteosarcoma cells MG-63[J]. Neoplasma, 2010, 57(6): 501-506.

[10] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749-762.

(本文编辑:万静)

· 消息 ·

欢迎订阅 2013 年《中华实用儿科临床杂志》

《中华实用儿科临床杂志》(原《实用儿科临床杂志》)是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办的中华系列杂志,是以儿科临床与基础研究为主要报道内容的儿科学类国家级核心期刊。本刊为儿科学类核心期刊、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),RCCSE 中国核心学术期刊,中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,中国科学技术协会精品科技期刊,被 WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国生物医学文献数据库(CBMdisc)、Quick 全文资料管理系统(FTME)、中文科技期刊数据库、中国学术期刊(光盘版)、万方数据、美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼文摘》、美国《乌利希斯期刊指南》等国内外数十家权威数据库收录。以贯彻党和国家的卫生工作方针、政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针,反映国内外儿科医疗、科研等方面的新理论、新技术、新成果、新进展,促进学术交流为办刊宗旨。辟有专家论坛、学术争鸣、热点、论著、小儿神经基础与临床、中西医结合、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例(理)讨论、病例报告、临床应用研究、英文原著、诊断标准·治疗方案、继续教育等栏目。以各级医院儿科医务工作者,各高等医学院校、科研院所儿科医教研人员,各级图书馆(室)、科技情报研究院(所)研究人员等为读者对象。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研人员踊跃投稿,本刊对国家级、省部级科研课题和基金资助项目论文发表开辟绿色通道。本刊为半月刊,大16开本,80页,铜版纸印刷,每月5、20日出版。CN 10-1070/R,ISSN 2095-428X,CODEN SELZBJ,Dewey #:618.92。国内外公开发行,国内邮发代号:36-102,国外邮发代号:SM 1763。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研人员,全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究院(所)通过全国各地邮局订阅,也可与本刊编辑部直接联系订阅邮购。国内定价:10.00元/期,240.00元/年;国外定价:10.00美元/期,240美元/年。联系地址:453003 河南省新乡市金穗大道601号新乡医学院《中华实用儿科临床杂志》编辑部。联系电话:0373-3029144,0373-3831456;传真:0373-3029144;E-mail: syqk@ chinajournal. net. cn;syqk@ xxmu. edu. cn。