

实验研究

人参皂甙对人 T 淋巴细胞白血病细胞株凋亡基因的影响

凌昌全¹ 俞超芹¹ 潘瑞萍¹ 黄雪强¹ 张登海²

摘要 本研究应用 DNA 断裂点标记法(TUNEL)、DNA 凝胶电泳、光镜及 RT-PCR 等技术探讨人参皂甙对人 T 淋巴细胞白血病细胞株(6T-CEM)凋亡基因的影响。结果:放线菌酮、放线菌素 D 本身可诱导 6T-CEM 细胞凋亡;人参皂甙+放线菌酮、人参皂甙+放线菌素 D 两组的凋亡率与放线菌酮、放线菌素 D 组差异无显著性。人参皂甙可使 6T-CEM 细胞 Bcl-2、bax 基因表达显著降低,其中 Bcl-2 降低尤为明显。提示放线菌酮或放线菌素 D 通过抑制某些抗凋亡蛋白的合成而诱导 6T-CEM 细胞凋亡。人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡的机理是通过抑制 bcl-2 基因表达、降低 bcl-2/bax 比率,从而诱导细胞凋亡。

主题词 白血病,淋巴细胞,急性/中医药疗法 人参皂甙/药理学 肿瘤细胞,培养的/药物作用

近年来的研究发现,人参皂甙可预防和治疗肿瘤,如人参皂甙对急性非淋巴细胞白血病细胞及对单核样白血病系 U-937 细胞有诱导分化作用^[1~3],可使肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞由 G₁/G₀ 期进入 S 期,同时阻止 S 期细胞进 G₂/M 期,抑制细胞增殖^[4]。我们以往的实验结果表明,人参皂甙可显著抑制人急性白血病 T 淋巴细胞株 6T-CEM 细胞的增殖,诱导 6T-CEM 细胞凋亡,并有明显的时间和剂量效应。本研究通过观察放线菌素 D 和放线菌酮对人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡的影响及人参皂甙对 6T-CEM 细胞凋亡基因表达的影响,进一步探讨人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡的机理。

1 材料和方法

1.1 材料:6T-CEM(中国科学院上海分院细胞所)用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640(GBICO)安全培养液培养。人参皂甙(第二军医大学药学院提供);DNA 断裂点标记(TUNEL)标记液、Streptavidin-AP、碱性磷酸酶底物(NBT/BCIP,德国宝灵曼公司);放线菌素 D 和放线菌酮(华美公司);总 RNA 抽提试剂盒(华顺公司);AMV 反转录试剂盒(Promega);

TaG DNA 聚合酶(华美公司);PCR 仪(PE,2400);扩增相关基因引物(中国科学院上海分院生化所合成)。

1.2 方法

1.2.1 放线菌酮和放线菌素 D 对人参皂甙细胞毒性影响:6T-CEM 细胞调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,将细胞分成 6 组:(1)空白对照组;(2)5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌酮组;(3)0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌素 D 组;(4)50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人参皂甙组;(5)人参皂甙+放线菌酮组;(6)人参皂甙+放线菌素 D 组。培养 15 小时后,计数台盼兰染色阳性死亡细胞。

1.2.2 放线菌素 D 和放线菌酮对人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡影响:(1)调整 6T-CEM 细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,接种在进口 24 孔板中。(2)将细胞分成 6 组,方法同毒性实验。(3)37℃ 二氧化碳孵箱内继续培养 15 小时,收集细胞悬液,离心,去上清,加入 40% 甲醛,固定 15 分钟,离心,PBS 洗涤。(4)加穿透液(含 0.1% TritonX-100、0.1% NaAc),PBS 洗涤。(5)在显微镜下点片,凉干。(6)TUNEL 标记液作用 60 分钟,37℃ 水浴。(7)PBS 洗涤,TUNEL Buffer 1 洗涤背景。(8)加 Streptavidin-AP 置 37℃ 水浴 30 分钟。(9)NBT/BCIP 显微镜下显色。(10)核固红复染。(11)自然干燥后中性树胶封片。显微镜下计数阳性细胞。细胞核染成蓝色为阳性细胞。

1.2.3 人参皂甙对凋亡相关基因的影响:(1)6T-CEM 细胞调整为 $1 \times 10^7/\text{ml}$,分别与 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人参皂甙、0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 羟基喜树碱共育 15 小时,收集细胞。mRNA 抽提,mRNA 反转录分别按试剂盒说明操作,PCR 扩增按常规方法进行。(2)取 PCR 产物 20 μl ,2% 琼脂糖凝胶电泳,用密度扫描仪对特异性条带进行密度扫描,各基因扫描值用同一标本 β -actin 扫描值进行校对。

1.2.4 统计学处理:采用 t 检验。

2 结果

2.1 放线菌酮和放线菌素 D 对人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡及细胞毒性影响:台盼兰染色结果显示,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放线菌酮、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 人参皂甙对 6T-CEM 细胞毒性较小,其台盼兰染色阳性率与空白对照组无明显区别,但人参皂甙+放线菌酮对 6T-CEM 细胞

1 中国人民解放军第二军医大学长海医院中医科,上海市长海路(200433)

2 中国人民解放军第二军医大学长征医院

收稿日期:1998-06-18

毒性明显增加。 $5\mu\text{g/ml}$ 放线菌酮、 $0.125\mu\text{g/ml}$ 放线菌素 D 可显著诱导 6T-CEM 细胞凋亡。人参皂甙+放线菌酮、人参皂甙+放线菌素 D 两组的凋亡率与放线菌酮和放线菌素 D 组差异无显著性,见表 1。

表 1 放线菌酮和放线菌素 D 对人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡及细胞毒性的影响($\bar{x}\pm s$)

分 组	标本数	台盼兰阳性率(%)	细胞凋亡率(%)
空白对照组	3	6.94 ± 0.68	10.73 ± 1.25
人参皂甙组	3	7.32 ± 0.5	$17.04\pm 2.35^*$
放线菌酮组	3	6.48 ± 0.73	$29.35\pm 3.24^*$
放线菌素 D 组	3	$10.20\pm 1.86^*$	$40.94\pm 5.96^*$
人参皂甙+放线菌酮组	3	$11.04\pm 1.78^*$	$30.22\pm 2.55^*$
人参皂甙+放线菌素 D 组	3	$27.44\pm 3.59^*$	$42.53\pm 5.67^*$

与空白对照组比较, * $P<0.05$

2.2 TUNEL:显微镜下所见,细胞收缩变小,染成蓝色的为凋亡细胞(图略)。

2.3 人参皂甙、羟基喜树碱对 6T-CEM 细胞相关凋亡基因表达的影响:PCR 产物电泳结果及对特异性条带密度扫描显示,人参皂甙能导致所有凋亡相关基因下降,其中 bcl-2 下降尤其明显。羟基喜树碱主要是 bcl-2 下降,并且伴有促凋亡基因 ICE 表达增加,见表 2。

表 2 6T-CEM 细胞各种相关凋亡基因表达量相对比值($\bar{x}\pm s$)

药物	标本数	bcl-2(%)	bax(%)	bcl-x1(%)	ICE(%)
人参皂甙	3	40.0 ± 12.6	78.0 ± 21.2	70.0 ± 16.8	87.0 ± 16.2
羟基喜树碱	3	61.0 ± 9.0	46.0 ± 12.0	123.0 ± 47.0	168.0 ± 33.0

注:正常对照组定为 100%;计算公式(以人参皂甙 bcl-2 为例,其它基因相同): $(\text{人参皂甙 bcl-2 密度值}/\text{人参皂甙 } \beta\text{-actin 密度值})/(\text{对照 bcl-2 密度值}/\text{对照 } \beta\text{-actin 密度值})\times 100\%$

3 讨论

细胞凋亡是一种主动的、由遗传控制的程序性现象,是主动自杀过程。正常情况下细胞增殖与细胞凋亡之间保持着一种动态平衡,这种平衡是维持多细胞生物自身稳定的重要因素。当细胞增殖失控或细胞凋亡受阻都可导致肿瘤发生。已有研究表明,白血病发生机制之一是凋亡抑制基因表达增强或(和)凋亡活化基因受抑。放线菌酮或放线菌素 D 能抑制 RNA 的合成,作用于 mRNA,干扰细胞的转录过程,阻止蛋白质的合成。已有研究表明,在细胞凋亡早期存在有新的大分子蛋白质的主动合成,此时用 RNA 和蛋白质抑制剂放线菌酮或放线菌素 D 可明显抑制凋亡^[5]。我们的实验结果显示,放线菌酮、放线菌素 D 本身可诱导 6T-CEM 细胞凋亡;人参皂甙+放线菌酮、人参皂甙+放线菌素 D 两组的凋亡率与放线菌酮、放线菌素 D 组无

显著差异,并未因人参皂甙本身可诱导 6T-CEM 细胞凋亡而出现迭加。提示 6T-CEM 细胞存在抗凋亡蛋白的高表达,放线菌酮、放线菌素 D 通过抑制某些抗凋亡蛋白的表达而诱导 6T-CEM 的凋亡。人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡作用的机理可能与阻碍抗凋亡基因的表达有关。Bcl-2、bax 和 bcl-XL 均属于 bcl-2 家族。Bcl-2 定位于人染色体 18q21.3,有 3 个外显子,编码一个含 229 个氨基酸的膜蛋白,具有抗凋亡作用;bax 可与 bcl-2 形成异二聚体,bcl-2/bax 比率是影响细胞凋亡的关键,如 bcl-2 表达高,则抑制细胞凋亡,反之,则促进细胞凋亡^[6,7];bcl-XL 起抑制细胞凋亡作用。ICE 家族有 6 个成员,包括 ICE、ICE_{rel} I 等,ICE 家族高表达可引起细胞凋亡^[8]。已有许多证据表明,ICE 家族是凋亡信号传导过程中的共同途经。6T-CEM 细胞存在抗凋亡蛋白的高表达,放线菌酮或放线菌素 D 通过抑制某些抗凋亡蛋白的合成而诱导 6T-CEM 细胞凋亡。人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡的机理是通过抑制 bcl-2 基因表达、降低 bcl-2/bax 比率,从而诱导细胞凋亡。羟基喜树碱除抑制抗凋亡基因 bcl-2 表达,还明显增加促凋亡基因 ICE 的表达。因此,人参皂甙诱导 6T-CEM 细胞凋亡的机理与羟基喜树碱不完全一致。这些研究结果为证实人参具有直接抗癌作用提供了部分有意义的实验依据。

参考文献

- 1 陆平成,张旭,周坤福,等.人参皂甙联合 TNF 对肿瘤的作用.南京中医药大学学报,1995,11(4):27-29.
- 2 马文彬.应用流式细胞光度计研究人参皂甙单体 RH1 和 RH2 对小鼠 S₁₈₀肉瘤细胞周期移行的影响.白求恩医科大学学报,1991,(6):551-553.
- 3 李薇,易永林,李兆华.人参茎叶总皂甙对单核样白血病细胞系 U-937 诱导分化作用.白求恩医科大学学报,1994,20(4):384-385.
- 4 张燕军,夏天,赵建斌.人参皂甙 RB-1 和苦参碱对 SMMC-7721 细胞周期和 DNA 含量的流式细胞仪研究.陕西中医药,1997,18(2):93-94.
- 5 Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol, 1984, 142: 67.
- 6 Gillardon F, Wichert H, Zimmermann M. Up-regulation of bax and down-regulation of bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. Neurosci Lett, 1995, 192: 85-88.
- 7 Krajewski S, Bolmqvist C, Franssila K, et al. Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in woman with metastatic breast adenocarcinoma. Cancer Res, 1995, 55: 4471.
- 8 Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. Cell, 1995, 82: 349-352.