



· 药理 ·

# 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 诱导人白血病 K562 细胞株衰老的实验研究

蔡世忠, 周玥, 刘俊, 刘典峰, 姜蓉, 王亚平\*

(重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的:观察人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (Rg<sub>1</sub>) 诱导人白血病 K562 细胞株衰老的作用及其机制。方法:MTT 比色法检测 Rg<sub>1</sub> 对 K562 细胞增殖的影响,筛选最佳作用浓度及时间(20 μmol · L<sup>-1</sup>, 48 h)。流式细胞术检测 Rg<sub>1</sub> 对细胞周期的影响;SA-β-Gal 染色检测细胞阳性染色百分率;RT-PCR 法检测衰老相关基因 p16, p53, p21, Rb 的表达;电镜观察细胞衰老超微形态学改变。结果:Rg<sub>1</sub> 在体外能明显抑制 K562 细胞增殖,使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期;SA-β-Gal 染色阳性细胞百分率显著增高(P < 0.05);细胞衰老相关基因的表达上调(P < 0.05);超微结构观察显示细胞增大,异染色质凝集、碎裂,线粒体体积增大,溶酶体体积增大、数目增多等衰老形态学变化。结论:Rg<sub>1</sub> 能诱导 K562 细胞衰老,p53-p21-Rb, p16-Rb 信号转导通路在其衰老调控中起重要作用。

**[关键词]** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 白血病; K562 细胞株; 细胞衰老

细胞衰老是指细胞生理功能、增殖能力衰减,细胞周期停滞伴形态学改变,且渐趋于死亡的不可逆现象<sup>[1]</sup>。鉴于肿瘤细胞的“永生”特点和无限增殖能力,认为肿瘤细胞可能存在衰老通路障碍或失去进入衰老程序的能力。肿瘤细胞衰老通路障碍可影响其增殖能力和放化疗效果,也是肿瘤多药耐药性的主要原因之一。有研究表明,低于诱导凋亡剂量的化疗药物可诱导肿瘤细胞衰老<sup>[2-3]</sup>。人参作为中医临床“补气”要药,对正常细胞和异常细胞有着双向调节作用,作者既往研究证实,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 能有效延缓造血干/祖细胞衰老<sup>[4-5]</sup>,但它对白血病细胞有无衰老调控作用尚无报道。本研究探讨人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 诱导人白血病细胞株衰老的生物学及其相关机制,旨在为天然药物有效成分促进肿瘤细胞的衰老提供实验依据,为白血病等肿瘤的治疗提供新的思路和方法。

## 1 材料

K562 细胞株由重庆医科大学检验医学院惠

赠。人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 购自吉林宏久有限公司(纯度 98.6%),用 RPMI-1640 培养液配制成 1 g · L<sup>-1</sup> 的溶液,过滤除菌。RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。MTT 比色实验相关试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。衰老相关-β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色试剂盒购自美国 Cell Signaling 公司。RT-PCR 相关试剂购自 TAKARA 公司,引物由上海 Sangon 公司合成。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 将 K562 细胞株接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养体系中,置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的恒温培养箱中培养,每 2 d 更新细胞培养液并传代。

**2.2 MTT 比色实验** 取对数生长期的 K562 细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1 × 10<sup>8</sup> 个/L,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养,以每孔 200 μL 接种于 96 孔板,设立只有培养液而无细胞的空白对照组,用于比色时调零。以终浓度为 0(对照组), 5, 10, 20, 40, 80 μmol · L<sup>-1</sup> 的人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 作用于 K562 细胞,每组设立 4 个复孔,分别作用 24, 48, 72 h, 570 nm 波长进行呈色和比色,酶联免疫检测仪测定各孔 A。细胞增殖抑制率 = 1 - (A<sub>实验组</sub> / A<sub>对照组</sub>)。

**[稿件编号]** 20110823011

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30973818);重庆市科委自然科学基金重点项目(CSTC, 2009BA5038)

**[通信作者]** \* 王亚平,教授,博士生导师,主要从事实验血液学、干细胞生物学研究, Tel: (023)68485968, E-mail: ypwangcq@yahoo.cn

**[作者简介]** 蔡世忠,博士研究生, Tel: (021)25078875, E-mail: csz.chn@gmail.com



**2.3 细胞周期分析** 实验组选用终浓度为 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  人参皂苷  $\text{Rg}_1$  作用 48 h 的 K562 细胞, 对照组常规培养 48 h。分别收集 2 组细胞, 70% 乙醇固定。PI 染色 30 min, FACS Vantage SE 流式细胞仪 (Becton Dickinson, USA) 检测碘化丙啶荧光强度, Cell Quest Pro 分析细胞周期变化。

**2.4 SA- $\beta$ -Gal 染色分析** 分别收集对照组及实验组 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  人参皂苷  $\text{Rg}_1$ , 作用 48 h) 的 K562 细胞  $1 \times 10^6$  个, 洗涤 2 次, 固定细胞 15 min; 再洗涤 3 次, 加染色液 1 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 隔绝  $\text{CO}_2$  染色过夜。洗涤后离心涂片, 使每玻片的细胞数为  $1 \times 10^4$  个, 中性树胶封片镜检。每张涂片随机计数 400 个细胞并计算阳性细胞百分率。

**2.5 RT-PCR 检测 p53, p21, p16, Rb 基因的表达** 取对照组和实验组细胞用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 质量检测后用于 RT-PCR。取 1  $\mu\text{g}$  RNA 样本在 20  $\mu\text{L}$  反应体系中进行逆转录反应。取 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 上下游引物 ( $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.25  $\mu\text{L}$  于 50  $\mu\text{L}$  体系中进行 PCR 反应, 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 共 30 个循环。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物与含 1.5% 溴乙啶的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统照相并分析灰度值, 不同扩增产物与内参的比值进行半定量分析。引物设计如下: p53 上游引物 5'-TTTGAGGTGCGTGTTCGTGC-3', 下游引物 5'-ACTTCAGGTGGCTGGAGTGAG-3', 扩增片段为 304 bp; p21 上游引物 5'-CCCGTGAGCCGATGGAAGCTT-3', 下游引物 5'-GAAATCTGTCATGCTGGTCTGC-3', 扩增片段为 317 bp; p16 上游引物 5'-CAACGCACCGAATAGTTCAG-3', 下游引物 5'-GGGATGTCTGAGGGACCTC-3', 扩增片段为 351 bp; Rb 上游引物 5'-CTTTGTGAACGCCTTCTGTCTG-3', 下游引物 5'-TTCGAGGAATGTGAGGTATTGG-3', 扩增片段为 370 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物 5'-CTGGAAGGTGGA-CAGCGAGG-3', 扩增片段为 205 bp。

**2.6 超微结构观察** 取实验组、对照组细胞  $1 \times 10^5$  个, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 2.5% 戊二醛先固定细胞 6 h, 1% 四氧化锇后固定 2 h, 乙醇逐级脱水、树脂包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀和硝酸铅电子染色, H-600 型透射电镜观察并照相。

**2.7 统计学分析** 用 SPSS 14.0 软件对数据进行

统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对 K562 细胞的增殖抑制作用** 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  在一定浓度范围内 ( $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 K562 细胞的体外增殖有显著抑制作用。并与药物作用时间和浓度梯度呈正相关, 以 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  终浓度干预 48 h 时表现出最大增殖抑制率 (图 1)。

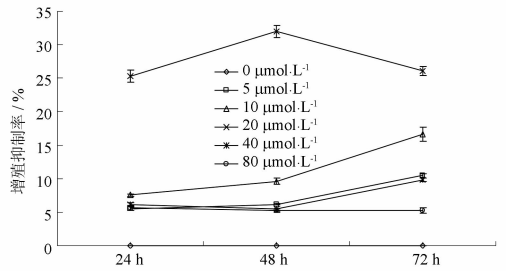


图 1 不同浓度人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对 K562 细胞增殖抑制率  
Fig. 1 Effect of  $\text{Rg}_1$  on proliferation of K562 cells *in vitro*

**3.2 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对 K562 细胞周期分布的影响** 与对照组相比, 实验组细胞 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ) 24 h 后细胞明显阻滞于  $G_2/M$  期, 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  处理 24, 48, 72 h 后 S 期细胞百分率基本恒定。实验组  $G_2/M$  期细胞百分率相对于对照组明显增高 ( $P < 0.05$ , 图 2)。

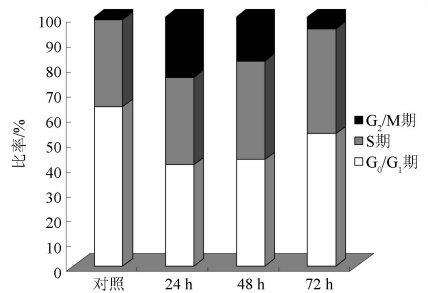


图 2 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对 K562 细胞周期分布的影响  
Fig. 2 Effect of  $\text{Rg}_1$  on cell cycle disposition of K562 cells

**3.3 参皂苷  $\text{Rg}_1$  对 K562 细胞 SA- $\beta$ -Gal 染色的影响** 与对照组相比, 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  人参皂苷  $\text{Rg}_1$  作用 K562 细胞 48 h, SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率显著增加, 提示实验组细胞呈现明显衰老改变, 2 组差异具有统计学

意义 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

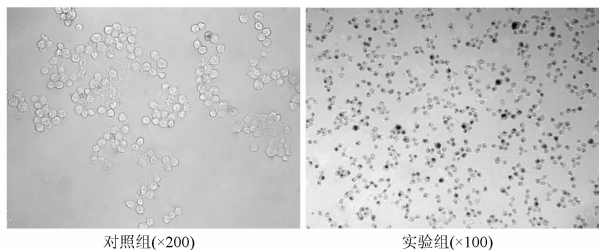
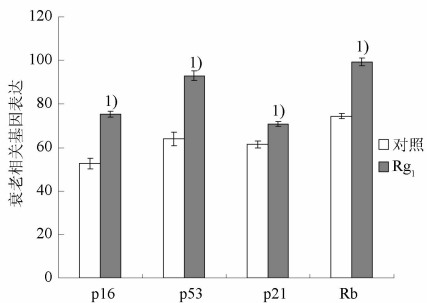
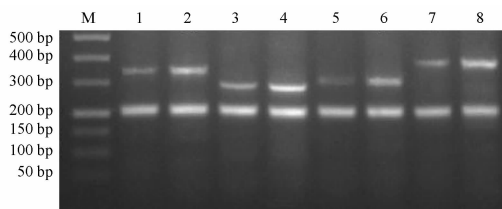


图 3 人参皂苷  $Rg_1$  对 K562 细胞 SA- $\beta$ -Gal 染色的影响  
Fig. 3 Effect of  $Rg_1$  on SA- $\beta$ -Gal staining of K562 cells

**3.4 人参皂苷  $Rg_1$  对 K562 细胞衰老相关基因表达的影响** 提取 2 组细胞总 RNA, 逆转录后的衰老相关基因 p53, p21, p16, Rb 及内参  $\beta$ -actin 的 PCR 扩增, 将各产物与对应内参灰度的比值进行半定量分析, 结果表明, 实验组衰老相关基因表达增强 ( $P < 0.05$ , 图 4)。



1, 3, 5, 7. 对照组 p53, p21, p16, Rb; 2, 4, 6, 8. 实验组 p53, p21, p16, Rb; 与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 4 人参皂苷  $Rg_1$  对 K562 细胞衰老相关基因表达的影响  
Fig. 4 Effect of  $Rg_1$  on expression of senescence related gene in K562 cells

**3.5 人参皂苷  $Rg_1$  对 K562 细胞超微形态学的影响**

实验组细胞超微结构呈现染色质凝集、碎裂、核膜内陷、核内包含物形成; 线粒体体积增大; 溶酶体体积增大, 数目增多, 异染色质聚集等衰老表现 (图 5)。

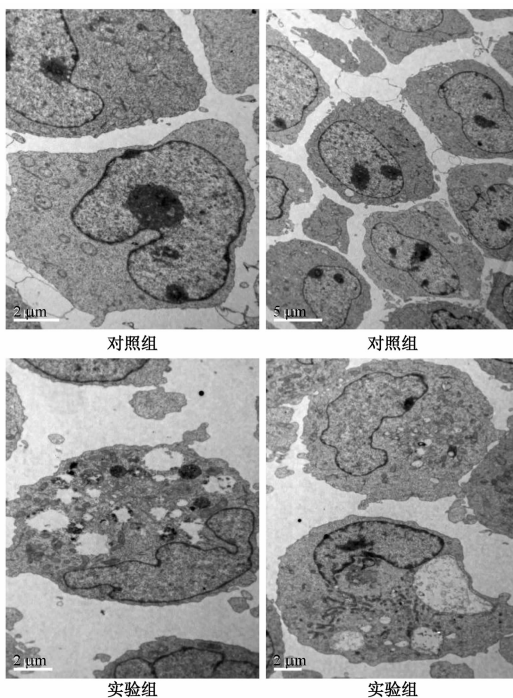


图 5 人参皂苷  $Rg_1$  对 K562 细胞衰老的超微形态学表现  
Fig. 5 Ultrastructure characteristics of  $Rg_1$  on senescence of K562 cells

## 4 讨论

近年来研究证实, 衰老并非正常细胞所独有的生物学特征, 肿瘤细胞也可经药物诱导而呈现衰老改变。衰老的肿瘤细胞高度增殖、转移等特性也随之衰减, 衰老的肿瘤细胞所出现的细胞周期阻滞也为周期特异性化疗药提供了可乘之机。以往的研究热点是诱导肿瘤细胞凋亡, 或自噬体介导的细胞器降解所致的细胞死亡<sup>[6]</sup>, 然而低剂量化疗对凋亡的诱导绝非易事, 若提高剂量则药物不良反应也随之增加, 鉴于此, 寻找毒副作用小的药物诱导肿瘤细胞衰老, 或将为肿瘤的治疗打开一扇新的窗口。

人参是祖国医学“补气”要药, 现代研究证实, 人参及其有效成分对血细胞增殖与分化有明确的调控作用。本课题组研究发现, 人参皂苷  $Rg_1$  能有效延缓造血干细胞衰老, 这为人参“补气生血”的理论提供了现代分子生物学的依据。祖国医学还认为人参具有“攻补兼施”的双向调节作用, 那么人参皂苷  $Rg_1$  能否促进白血病细胞衰老? 如果能证明人参皂苷  $Rg_1$  能诱导白血病细胞衰老, 就能很好诠释人参的双向调节作用。本研究发现, 人参皂苷  $Rg_1$  在一定浓度范围内 ( $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 K562 细胞的



体外增殖有显著抑制作用,以终浓度  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 48 h 为最佳。周期阻滞是细胞衰老的重要表现,通过流式细胞术检测细胞周期分布发现,人参皂苷  $\text{Rg}_1$  能有效促进 K562 细胞呈现  $\text{G}_2/\text{M}$  期阻滞。 $\text{SA-}\beta\text{-Gal}$  染色实验是经典和公认评价细胞衰老的关键生物标记<sup>[7]</sup>,当 pH 为 6 时  $\text{SA-}\beta\text{-Gal}$  表达仍然增强,则说明细胞进入衰老状态,本实验观察到人参皂苷  $\text{Rg}_1$  作用 K562 细胞后  $\text{SA-}\beta\text{-Gal}$  染色阳性率显著增加,提示人参皂苷  $\text{Rg}_1$  有调控白血病细胞衰老的作用。 $\text{p53-p21}$  是一条重要的细胞衰老相关通路, $\text{p53}$  能在转录水平激活  $\text{p21}$  的表达,主要介导端粒依赖的复制性衰老和(或)多种应激诱导的如 DNA 损伤所致的衰老, $\text{p21}$  能结合多种  $\text{cyclin-CDK}$  复合物从而抑制其活性,所以在调控  $\text{G}_1$  期和  $\text{G}_2/\text{M}$  期阻滞中扮演重要角色<sup>[8-9]</sup>。另一条细胞衰老相关信号转导通路是  $\text{p16-Rb}$ ,该通路则介导多种形式的非基因毒性应激,诸如染色质重构诱发的细胞衰老<sup>[10]</sup>。2 条衰老相关信号转导通路共同归结于  $\text{Rb}$  基因,后者是细胞周期调节因子,其主要调控细胞  $\text{G}_0$  和  $\text{G}_1$  期过渡到 S 期的过程<sup>[11]</sup>。研究还发现,人参皂苷  $\text{Rg}_1$  作用 K562 细胞后衰老相关基因  $\text{p53}$ ,  $\text{p21}$ ,  $\text{p16}$ ,  $\text{Rb}$  表达高于对照组,初步表明人参皂苷  $\text{Rg}_1$  激活了衰老相关信号转导通路。超微结构改变如染色质凝集、碎裂、核膜内陷、核内包含物形成;线粒体体积增大;溶酶体增大,数目增加,异染色质的聚集<sup>[12]</sup>等改变同样支持  $\text{Rg}_1$  可诱导 K562 细胞进入衰老状态。

综上所述,本研究结果提示,人参皂苷  $\text{Rg}_1$  能诱导人白血病 K562 细胞株呈现衰老改变,这可能与人参皂苷  $\text{Rg}_1$  激活细胞衰老相关信号转导通路有关。结合课题组前期研究,笔者认为这可能是人参“攻补兼施”的双向调节作用机制之一。对于白血病的临床治疗也可以考虑“先致老,后致死”的新策

略。另外,衰老改变也给其他化疗药物提供了新的作用靶点。

#### [参考文献]

- [1] 蔡世忠,王亚平. 细胞衰老与细胞自噬的生物学关联及其意义[J]. 生命科学, 2011, 23(4): 335.
- [2] Te Poele R H, Okorokov A L, Jardine L, et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1876.
- [3] Rebbaa A, Zheng X, Chou P M, et al. Caspase inhibition switches doxorubicin - induced apoptosis to senescence [J]. *Oncogene*, 2003, 22(18): 2805.
- [4] 周玥,姜蓉,杨斌,等. 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  延缓造血干细胞衰老过程中端粒长度和端粒酶活性的变化[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3172.
- [5] 周玥,杨斌,姚欣,等. 人参皂苷  $\text{Rg}_1$  延缓造血干细胞衰老与  $\text{p16}^{\text{INK4a}}$  表达关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 608.
- [6] Gewirtz D A. Autophagy as a mechanism of radiation sensitization in breast tumor cells [J]. *Autophagy*, 2007, 3(3): 249.
- [7] Itahana K, Campisi J, Dimri G P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 371: 21.
- [8] d'Adda di Fagnana F, Teo S H, Jackson S P. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(15): 1781.
- [9] Wiebusch L, Hagemeyer C.  $\text{p53-}$  and  $\text{p21-}$ dependent premature APC/C-Cdh1 activation in  $\text{G}_2$  is part of the long-term response to genotoxic stress [J]. *Oncogene*, 2010, 29(24): 3477.
- [10] Ohtni N, Yamakoshi K, Takahashi A, et al. The  $\text{p16}^{\text{INK4a-RB}}$  pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression [J]. *J Med Invest*, 2004, 51(3/4): 146.
- [11] Sherr C J, DePinho R A. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock [J]. *Cell*, 2000, 102(4): 407.
- [12] Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence [J]. *Cell*, 2003, 113(6): 703.



## Experimental study on human leukemia cell line K562 senescence induced by ginsenoside Rg<sub>1</sub>

CAI Shizhong, ZHOU Yue, LIU Jun, LIU Dianfeng, JIANG Rong, WANG Yaping\*  
(Department of Histology and Embryology, Institute of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective:** To observe the effect and mechanism of ginsenoside Rg<sub>1</sub> in inducing senescence human leukemia K562 cell line. **Method:** Proliferation of K562 cell line induced by Rg<sub>1</sub> was detected by MTT colorimetric test for the purpose to screen optimal active concentration and time (20 μmol · L<sup>-1</sup>, 48 h). Impact of Rg<sub>1</sub> on cell cycle was analyzed using flow cytometry. The percentage of staining positive cells was detected by SA-β-Gal staining. The expressions of senescence-related genes such as p16, p53, p21, Rb, were detected by RT-PCR and the changes in ultramicro-morphology were observed by transmission electron microscopy. **Result:** Rg<sub>1</sub> can significantly inhibit the proliferation of K562 cells *in vitro* and arrest the cells in G<sub>2</sub>/M phase. The percentage of positive cells stained by SA-β-Gal was dramatically increased ( $P < 0.05$ ) and the expression of cell senescence-related genes were up-regulated. The observation of ultrastructure showed that cell volume increase, heterochromatin condensation and fragmentation, mitochondrial volume increase, lysosomes increase in size and number. **Conclusion:** Rg<sub>1</sub> can induce the senescence of leukemia cell line K562 and play an important role in regulating p53-p21-Rb, p16-Rb cell signaling pathway.

[**Key words**] ginsenoside Rg<sub>1</sub>; leukemia; K562 cell line; cell senescence

doi:10.4268/cjcmm20121616

[责任编辑 张宁宁]